

***Nerve Growth Factor (NGF) vermitteltes Überleben
pulmonaler Plasmazellen in der Atemwegsentzündung des
murinen allergischen Asthma bronchiale***



Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Melanie Abram

aus Naumburg/Saale

Marburg 2009

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität
als Dissertation angenommen am:

2009

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker
Zweitgutachter: Prof. Dr. Harald Renz

Tag der Disputation am:

02. November 2009

„Holzhacken ist deshalb so beliebt, weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht.“

Albert Einstein

Inhaltsübersicht

Inhaltsverzeichnis	2
1 Einleitung	6
2 Material und Methoden	31
3 Ergebnisse	58
4 Diskussion	91
5 Zusammenfassung	117
5 Summary	119
Literatur	120
Publikationen	136
Anhang	138

Inhaltsverzeichnis

INHALTSÜBERSICHT	1
INHALTSVERZEICHNIS	2
1. EINLEITUNG	6
1.1. Angeborenes und adaptives Immunsystem.....	6
1.2. Lymphozyten	7
1.2.1. T- Lymphozyten	8
1.2.2. B-Lymphozyten.....	9
1.3. Die humorale Immunantwort	10
1.3.1. Aufbau und Funktion der Antikörper	10
1.3.2. B-Zell Aktivierung	13
1.3.3. Lebensspanne von Plasmazellen	16
1.3.4. Konzept der Überlebensnische	19
1.4. Allergie und allergisches Asthma bronchiale	21
1.4.1. Pathophysiologie	21
1.4.2. Immunpathogenese.....	22
1.4.3. Neurotrophine.....	25
1.4.4. Tiermodell des allergischen Asthma bronchiale	27
ZIELSETZUNG.....	29
2. MATERIAL & METHODEN	31
2.1. Übersicht über die verwendeten Materialien.....	31
2.2. Tiere und Behandlungsprotokolle	37
2.2.1. Mausstämme.....	37
2.2.2. Induktion der allergischen Atemwegsentszündung mittels Ovalbumin Sensibilisierung und mukosaler Provokation.....	37
2.2.3. Lokale Inhibition des TrkA-Rezeptor	38
2.2.4. Gewinnung von Serumproben.....	39
2.2.5. Broncho-alveoläre Lavage (BAL).....	39
2.3. Zellpräparation.....	40
2.3.1. Zellzahlbestimmung	40
2.4. Durchflusszytometrische Analyse	41
2.4.1. Prinzip der Durchflusszytometrie.....	41
2.4.2. Oberflächenfärbung.....	41
2.4.3. Intrazelluläre Färbungen.....	42
2.4.4. Bestimmung der Zellvitalität mittels Durchflusszytometrie	42

2.5. Isolierung und Kultivierung von Plasmazellen	43
2.5.1 Zellisolierung	43
2.5.1.1. Magnetische Zellisolierung	43
2.5.1.2. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung.....	44
2.5.2. Isolierung der Plasmazellen	44
2.5.3. Kultivierung von Plasmazellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen	46
2.5.3. Generierung von Plasmazellen <i>in vitro</i>	47
2.6. Molekularbiologische Analysen	48
2.6.1. RNA-Isolation	48
2.6.2. Reverse Transkription (RT)	49
2.6.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	49
2.6.4. Quantitative PCR (qPCR)	50
2.6.5. Transfektion mit TrkA-spezifischer siRNA	51
2.7. Bestimmung der Zellvitalität und Proliferationsaktivität	51
2.7.1. CellTiterBlue Assay	52
2.7.2. Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay	52
2.7.3. Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemilumineszent)	52
2.8. Quantitativer Nachweis von Serumimmunglobulinen durch ELISA	53
2.8.1. Konzentrationsbestimmung von Serumimmunglobulinen	53
2.8.2. Nachweis von NGF im Überstand von stimulierten MNCs.....	54
2.9. Histologie von Gewebsschnitten.....	54
2.9.1. Anfertigung von Gewebsschnitten	54
2.9.2. Immunfluoreszenzfärbung	55
2.9.2. Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung	55
2.9.3. Nachweis apoptotischer Zellen in Gewebsschnitten	56
2.10. Western Blot	56
2.11. Statistische Auswertung.....	57
3. ERGEBNISSE	58
3.1. Kinetik Allergen-spezifischer Plasmazellen in der allergischen Atemwegsentzündung	58
3.1.1. Reduktion der Anzahl Allergen-spezifischer Plasmazellen in der Lunge in Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs.	60
3.2. Einfluss von Neurotrophinen (NT) auf das Überleben von Plasmazellen <i>in vitro</i>.....	62
3.2.1 Unterschiede in der Neurotrophin-Rezeptor (Trk) Expression von Plasmazellen der Lunge, der Milz und des Knochenmarks.....	62
3.2.2. NGF und NT3-vermitteltes Überleben von pulmonalen Plasmazellen <i>in vitro</i>	64
3.2.3. Inhibierung des TrkA-Rezeptors auf Plasmazellen <i>in vitro</i>	68
3.2.4. NGF-induzierte Zunahme der mRNA Expression antiapoptotischer Proteine	70
3.3. Einfluss von NGF und NT3 auf die mRNA-Expression antiapoptotischer Faktoren generierter Plasmazellen <i>in vitro</i>	71

3.4. Bestimmung der Zellvitalität und Antikörperproduktion von siRNA-transfizierten Mononukleären Zellen (MNC).....	73
3.4.1. Reduzierung der TrkA-Rezeptor Expression in aktivierten MNCs	74
3.4.2 Bestimmung der Zellvitalität von siRNA-transfizierten MNCs	76
3.5. Einfluss des TrkA-Rezeptors auf das Überleben von Plasmazellen <i>in vivo</i>	79
3.5.1. Einfluss des TrkA-Inhibitors auf die Anzahl von Antikörper-sezernierende Zellen in der allergischen Atemwegsentzündung.....	79
3.5.2. Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen im Serum TrkA-Inhibitor behandelter Mäuse.....	84
3.5.3. Nachweis der Entzündungszellen in der Lunge und in der Broncho-Alveolären Lavage von TrkA-Inhibitor behandelten Mäusen	87
3.5.4. Nachweis apoptotischer Zellen in der Lunge von TrkA-Inhibitor behandelten Mäusen	89
4. DISKUSSION	91
4.1. Die Anwesenheit Allergen-spezifischer Plasmazellen in der Lunge ist entzündungsabhängig	91
4.2. NGF vermittelt das Überleben pulmonaler Plasmazellen in der allergischen Atemwegsentzündung	95
4.2.1. Plasmazellen der Lunge, der Milz und des Knochenmarks zeigen unterschiedliche Expressionsmuster von Trk-Rezeptoren	95
4.2.2. NGF und NT3 vermitteln das Überleben von pulmonalen Plasmazellen <i>in vitro</i>	98
4.2.2. NGF und NT3 regulieren die Expression antiapoptotischer Proteine in Plasmazellen	101
4.2.3. Differenzierte Rolle des TrkA-Rezeptors in MNCs der Lunge und Milz.....	107
4.3. Rolle von NGF/TrkA für die lokale Antikörperproduktion innerhalb der allergischen Atemwegsentzündung.....	109
4.4. Ausblick.....	115
5. ZUSAMMENFASSUNG	117
5. SUMMARY	119
LITERATUR	120
PUBLIKATIONEN	136
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	138
DANKSAGUNG	140
ERKLÄRUNG.....	142

1. Einleitung

Das Immunsystem stellt ein komplexes Abwehrsystem zum Schutz des Organismus höherer Lebewesen gegen eine Vielzahl von Pathogenen, körperfremden Stoffen sowie körpereigenen entarteten Zellen dar. Es besteht im Wesentlichen aus den lymphatischen Organen, den verschiedenen lymphatischen Zellen und zahlreichen spezialisierten Molekülen zur Abwehr und Signalübertragung bei der Bekämpfung von Pathogenen. Durch das Zusammenspiel dieser Faktoren ist der Organismus in der Lage, Krankheitserreger zu erkennen und effektiv zu bekämpfen. Eine durch den Organismus oder der Umwelt bedingte Fehlregulation des Immunsystems kann zur Ausprägung überschießender Immunreaktionen führen. Eine solche Fehlregulation des Immunsystems stellen Allergien oder Autoimmunerkrankungen dar. In beiden Fällen spielen vor allem die hochspezialisierten Zellen der B-Zellreihe eine besondere Rolle. Deren terminal differenzierte Form, die Plasmazelle, ist in der Lage hochaffine Antikörper gegen harmlose Allergene wie z.B. Birkenpollen oder auch Selbstantigene zu sezernieren. Lokal gebildete Antikörper führen bei allergischem Asthma bronchiale zu einer chronischen Atemwegsentzündung, die durch Umbau und Vernarbungsprozesse („remodelling“) zu einer chronischen Lungenschädigung führen kann.

1.1. Angeborenes und adaptives Immunsystem

Grundsätzlich wird das Immunsystem in die: angeborene und die erworbene (adaptive) Immunität unterteilt. Beide unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wirkmechanismen und ihrer Spezifität. Die angeborene Immunität bildet die erste Verteidigungslinie bei der Bekämpfung von Pathogenen, insbesondere von Bakterieninfektionen. Dabei werden spezifische Pathogene nicht unterschieden, sondern über generelle Muster, die so genannten *pathogen-associated molecular patterns (PAMP)* unspezifisch identifiziert und eliminiert. Hauptkomponenten sind dabei Phagozyten wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten aber auch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie das Komplementsystem. (Podolsky 1999)

Die adaptive Immunität hingegen zeichnet sich über eine hohe Spezifität und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Die adaptive Immunität lässt sich in die zelluläre und die humorale Immunantwort unterteilen. Hier bilden die T- und B-Lymphozyten die Hauptkomponenten, welche durch die Ausprägung hochselektiver Rezeptoren in der Lage sind, spezifisch ein bestimmtes Antigen zu erkennen und hierdurch aktiviert zu werden. Nach

der erfolgten Aktivierung der Zellen durch ihr Antigen kommt es zur Ausdifferenzierung in Effektorzellen, welche anschließend in der Lage sind, das Antigen zu bekämpfen. Nach erfolgreicher Eliminierung des Antigens wird bei der Mehrheit der Effektorzellen die Apoptose eingeleitet, und die Entzündungsreaktion wird geklärt. Diese Immunantwort wird als primäre Immunantwort bezeichnet. Jedoch überlebt ein kleiner Teil dieser Zellen in Form so genannter Gedächtniszellen, die bei Wiederholung der gleichen Infektion die sekundäre Immunantwort, eine deutlich schnellere und effizientere Bekämpfung, einleiten können. Somit kann der Organismus vor erneuter Infektion mit dem gleichen Pathogen geschützt werden. Dieses Prinzip wird bei der Schutzimpfung gegen bestimmte Erreger angewendet.

1.2. Lymphozyten

Die Lymphozyten bilden die Grundlagen der adaptiven Immunantwort höherer Wirbeltiere. Sie werden im Knochenmark gebildet, und wandern anschließend zu peripheren Geweben, zirkulieren im Blut und im lymphatischen System und kehren zum Teil in das Knochenmark zurück. Aus dem gemeinsamen lymphoiden Vorläufer entstehen zwei Arten von Lymphozyten: B-Lymphozyten (B-Zellen), welche nach Aktivierung zu Antikörpersezernierenden Plasmazellen differenzieren (Liu, Zhang et al. 1991) und den T-Lymphozyten (T-Zellen). Die T-Zellen lassen sich in zwei Hauptklassen unterteilen: die zytotoxischen T-Zellen und die T-Helferzellen (Mosmann and Coffman 1989; Mosmann, Li et al. 1997). Beide Zellarten zeichnen sich durch ihre hochspezifische Erkennung von Antigenen aus. Diese wird vermittelt von spezifischen Rezeptoren, den B- und T-Zellrezeptoren auf der Zelloberfläche. Beide Rezeptortypen ähneln sich sowohl strukturell als auch funktionell. Die hohe Antigenspezifität spiegelt sich in der immensen Anzahl dieser Zellen mit unterschiedlicher Rezeptorspezifität wieder (ca. 10^{11}). Diese basiert u.a. auf dem Prozess der somatischen Rekombination, einer zufällige Zusammenlagerung von Gensegmenten im Genom, welche für die Rezeptorproteine codieren. Dies geschieht während des Entwicklungsprozesses von T- und B-Zellen, und wird durch anschließende Selektionsprozesse vollendet. Bei den Zellen der B-Zellreihe entspricht der B-Zellrezeptor zugleich dem Antikörpermolekül, das im Fall einer Aktivierung und Differenzierung zur Plasmazelle sezerniert wird. (Brandtzaeg, Farstad et al. 1999; Campbell, Yio et al. 1999)

1.2.1. T- Lymphozyten

Die T-Zellen entstehen im Knochenmark und wandern anschließend in den Thymus, wo ihre Reifung und Selektion stattfindet. Reife T-Zellen zirkulieren anschließend als naive T-Zellen solange zwischen Blut und Lymphsystem bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Nach Erkennung eines Antigens durch eine naive T-Zelle beginnt diese zu proliferieren und sich zu einer Effektorzelle zu differenzieren. Während B-Zellen ungebundene Proteinantigene direkt über ihren B-Zellrezeptor erkennen, können T-Zellen nur Peptide eines zuvor prozessierten Antigens, gebunden an ein MHC-Molekül (*Major Histocompatibility Complex*) auf der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle, (*APC- Antigen presenting cells*) erkennen (Germain 1994). Bei der Differenzierung entstehen mindestens drei funktionale Klassen von Effektorzellen, die zytotoxischen T-Zellen sowie den T_H1 und T_H2 Zellen.

Zytotoxische T-Zellen sind gekennzeichnet durch die Expression des CD8-Rezeptors auf ihrer Oberfläche. Dieses Oberflächenmolekül ermöglicht ihnen, zusammen mit dem T-Zellrezeptor an MHC I gebundene Peptid-Antigene auf der Zelloberfläche einer infizierten Zielzelle zu erkennen. Nach Erkennung und anschließender Differenzierung zu einer zytotoxischen Effektorzelle (Schweitzer and Sharpe 1998; London, Lodge et al. 2000) ist diese in der Lage, die Zielzelle eigenständig zu eliminieren. Zytotoxische T-Zellen spielen dadurch eine große Rolle bei der Immunantwort z.B gegen virale Infektionen.

Die zweite große Klasse von T-Zellen stellen die so genannten T-Helferzellen. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie nicht direkt, sondern über die Sekretion von Zytokinen bzw. durch die Expression membranständiger Moleküle andere Immunzellen stimulieren, ein Pathogen zu bekämpfen. Diese Zellen sind im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen über die Expression des CD4-Rezeptors gekennzeichnet. Sie erkennen Peptide von phagozytierten Bakterien, Toxinen und Pathogenen, welche sich in intrazellulären Vesikeln vermehren. Deren prozessierte Antigene werden über MHC II-Moleküle von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie den dendritischen Zellen (DCs) und B-Zellen präsentiert. Nachdem eine $CD4^+$ T-Helferzelle ($CD4^+$ T-Zelle) durch ihr Antigen aktiviert wurde kann sich diese zu zwei Typen von Effektorzellen, den T_H1 - bzw. T_H2 –Zellen, differenzieren (O'Garra and Arai 2000). Pathogene, welche sich in großer Zahl in Vesikeln von Makrophagen und dendritischen Zellen anhäufen, stimulieren die Differenzierung zu T_H1 -Zellen. Diese sind in der Lage, die anti-mikrobiellen Abwehrmechanismen von Makrophagen zu stimulieren, sowie die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen zu vermitteln. Antigene extrazellulärer Erreger hingegen scheinen präferentiell die Differenzierung zu T_H2 -Zellen zu

begünstigen. T_H2-Zellen initiieren die humorale Immunantwort durch die Aktivierung von B-Zellen, die anschließende neutralisierende Antikörpern verschiedener Isotypen (z.B. IgG.) produzieren.

Eine Einteilung in zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen erfolgt über die beiden Co-Rezeptoren CD4 und CD8. Zudem können diese über weitere Oberflächenmarker, aber auch über bestimmte Zytokinmuster, die eine spezifische T-Zellpopulation auszeichnen, kategorisiert werden (Janeway 1976).

1.2.2. B-Lymphozyten

Die B-Zellen sind die Hauptkomponenten der humoralen Immunantwort, welche unerlässlich für die Bekämpfung von Erregern im Organismus ist. Die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark ist ein geordneter Prozess, welcher abhängig vom Mikromilieu des Knochenmarks ist (Rosenberg and Kincade 1994; Nagasawa 2006). Hierbei stellen die Stromazellen über spezifische adhäsive Kontakte und über die Bildung bestimmter Wachstumsfaktoren wie dem *stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)* positive Signale an die sich entwickelnde B-Zelle bereit. So sind z.B. SDF-1 defiziente Mäuse nicht in der Lage, eine B-Zellreifung durchzuführen (Nagasawa, Hirota et al. 1996). Während des Entwicklungsverlaufes entstehen unterschiedliche Stadien der B-Zellen, welche durch verschiedene Stadien der somatischen Rekombination gekennzeichnet sind. Ziel dieser Entwicklungsprozesse ist die Bildung eines funktional aktiven B-Zellrezeptors auf der Oberfläche der Zelle. Dafür werden im Verlauf der Entwicklung die Gene, welche für bestimmte Abschnitte des B-Zellrezeptors codieren, zufällig rekombiniert, translatiert und letztendlich zu einem Rezeptor zusammengelagert auf der Oberfläche exprimiert. Scheitert dies, wird bei der entsprechenden B-Zelle die Apoptose eingeleitet und sie somit aus dem Pool entfernt. Ist der Prozess erfolgreich, exprimiert die B-Zelle einen funktionellen B-Zellrezeptor, welcher aus einem Immunglobulinmolekül mit einer Transmembrandomäne besteht. Die unreifen B-Zellen durchlaufen anschließend einen Reifungsprozess, in dessen Verlauf sie auf Selbsttoleranz und Überlebensfähigkeit in der Peripherie selektioniert werden. Überlebende Zellen werden nun als naive B-Zellen bezeichnet. Sie zirkulieren, ähnlich wie T-Zellen, im peripheren Lymphgewebe, bis sie auf ihr entsprechendes Antigen treffen (siehe 1.3.1) (Rolink and Melchers 1993; Melchers, ten Boekel et al. 2000).

Generell lassen sich B-Zellen in zwei große Klassen einteilen, die B1- und B2-Zellen. B1-Zellen repräsentieren eine Klasse von atypischen, sich selbst erneuernden B-Zellen, die

hauptsächlich in der Brust- und Bauchhöhle von Erwachsenen zu finden sind. Sie repräsentieren nur eine kleine Population von ca. 5% der B-Zellen im Menschen und der Maus. Sie besitzen ein stark eingeschränktes Rezeptorrepertoire im Vergleich zu den „klassischen“ B2-Zellen (Murakami and Honjo 1995; Hayakawa, Asano et al. 2003). Die Funktion der B1-Zellen wird derzeit noch stark debattiert aber ihr eingeschränktes Repertoire und eine verstärkte Reaktion auf Kohlenhydratantigene sowie die bevorzugte Bildung von Antikörpern des Isotyps IgM, lassen vermuten, dass diese Zellen vermutlich bei der angeborenen Immunantwort eine Rolle spielen. B2-Zellen werden während des gesamten Lebens im Knochenmark neu gebildet und zirkulieren im Blut- und Lymphgefäßsystem. Diese Zellen bilden die Grundlage der adaptiven Immunantwort. Da in dieser Arbeit die B1-Zellen nicht berücksichtigt wurden, werden zur Vereinfachung in dieser Arbeit die B2-Zellen als B-Zellen bezeichnet.

1.3. Die humorale Immunantwort

Die humorale Immunantwort bietet neben der zellulären Immunantwort Schutz vor extrazellulären Pathogenen sowie Toxinen. Während die zelluläre Immunantwort die Ausbreitung hauptsächlich intrazellulärer Erreger wie Viren, Protozoen und intrazelluläre Bakterien bekämpft, richtet sich die humorale Abwehr gegen Erreger in den extrazellulären Räumen und verhindert somit deren Ausbreitung im Organismus. Getragen wird sie dabei durch die Produktion löslicher Proteine, die als Antikörper bezeichneten Immunglobuline (Ig). Sie werden von den Endstadien der B-Zelldifferenzierung, den Plasmazellen, gebildet und in das Blutplasma und die extrazelluläre Flüssigkeit sezerniert. Im Folgenden sind der Aufbau und die Funktionen der Antikörper, ihre Entstehung sowie die Biologie der Antikörper-sezernierenden Plasmazellen zusammengefasst.

1.3.1. Aufbau und Funktion der Antikörper

Die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems haben sich im Verlauf der Evolution dahingehend entwickelt, die große Vielzahl von Antigenen spezifisch zu erkennen und zu bekämpfen. Dabei spielt die Bildung und Sekretion Antigen-spezifischer Antikörper eine entscheidende Rolle. Die Membran-gebundene Form von Immunglobulinen, auf der B-Zelloberfläche fungiert als Rezeptor für die Antigenerkennung und anschließende Aktivierung der B-Zelle und wird daher als *BCR*; *B-cell receptor* bezeichnet. Nach erfolgter Aktivierung

und weiterer Zellproliferation werden Immunglobuline gleicher Antigenspezifität, die Antikörper, von der terminal differenzierten B-Zelle, der Plasmazelle, sezerniert. Die biologische Funktion der Antikörper ist die Bindung und Markierung von Pathogenen. Derart markierte Pathogene sind für andere Immunzellen wie Makrophagen oder Granulozyten erkennbar, und können von diesen eliminiert werden.

Antikörpermoleküle besitzen eine Y-förmige Grundstruktur, die aus jeweils zwei leichten und schweren Polypeptidketten aufgebaut ist. Je eine leichte und eine schwere Peptidkette sowie die beiden schweren Ketten sind untereinander über Disulfidbrücken verbunden (siehe Abb. 1). Die Antikörperklasse, und somit die Effektorfunktion, wird durch die Struktur der schweren Ketten definiert. Dabei unterscheidet man fünf Hauptklassen bzw. Isotypen. Einige dieser Klassen werden zusätzlich noch in verschiedene Subtypen unterteilt, welche die spezifische Funktion des gesamten Antikörpermoleküls festlegen. Die fünf Immunglobulinklassen sind: Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin A (IgA) und Immunglobulin E (IgE). Die Bezeichnung der zugehörigen schweren Ketten wird in griechischen Buchstaben angegeben: μ , δ , γ , α und ϵ . Die Reihenfolge der angebenen Klassen entspricht der Reihenfolge, wie die entsprechenden codierenden Gene auf dem Chromosom angeordnet sind.

IgG ist mit Abstand das häufigste Immunglobulin und besitzt im Menschen mehrere Unterklassen (IgG1, 2, 3 und 4). Der durch die schweren Ketten determinierte Bereich des Antikörpermoleküls, der für die Effektormechanismen des Immunsystems zuständig ist, bezeichnet man als konstante Region (Clark 1997). Dieser liegt im so genannten *Fc*-Bereich (*fragment crystallizable*) und unterscheidet sich zwischen den Antikörperklassen. Hingegen werden die Bereiche der leichten und schweren Ketten, welche für die spezifische Antigenerkennung und Bindung zuständig sind, als variable Regionen bezeichnet. Da diese Region von den aminoterminalen Sequenzen der schweren und leichten Ketten gebildet wird, und folglich auf beiden „Armen“ des Y-förmigen Moleküls vorhanden ist, besitzt jedes Antikörpermolekül zwei Antigenbindungsstellen. Diese besitzen eine hohe Variabilität und sind hochspezifisch für ein bestimmtes Antigen. Die Affinität für die Antigenbindung kann während der Entstehung von Plasmazellen, der so genannten Affinitätsreifung (siehe 1.3.2.), durch das Einfügen von Punktmutationen in die Gene, welche für die hypervariablen Regionen der variablen Region kodieren, zusätzlich erhöht werden.

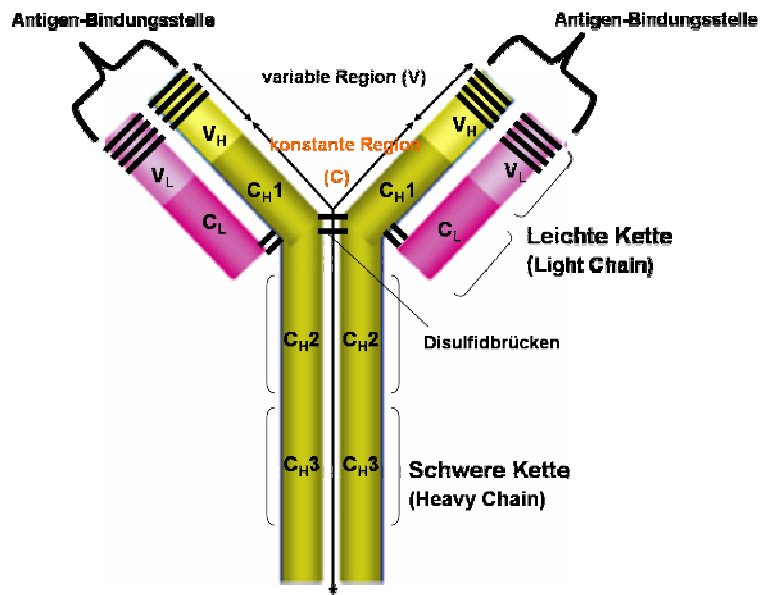


Abb.1.: Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls.

Die Wirkung der gebundenen Antikörper kann auf verschiedene Art stattfinden: Zum einen können sie direkt neutralisierend wirken, indem sie z.B. die Interaktion von Pathogen und Wirtszelle stören. Neutralisierende Antikörper spielen insbesondere bei der Abwehr von Viren und toxischen Substanzen eine große Rolle (Mandel 1976; Roost, Bachmann et al. 1995). Zum anderen können sie indirekt wirken, indem sie Zellen und Moleküle der angeborenen Immunität zur Unterstützung der Abwehr rekrutieren. Hierbei dienen die Antikörper der Opsonisierung d.h. der Markierung, von Erregern, die anschließend von Phagozyten über spezifische Rezeptoren, die Fc-Rezeptoren, erkannt und eliminiert werden. Die Fc-Rezeptoren sind Rezeptoren die spezifisch den Fc-Anteil von Antikörper erkennen. Dabei werden die verschiedenen Antikörperklassen unterschieden (Ravetch and Kinet 1991). Des Weiteren können gebundene Antikörper zur Aktivierung des Komplementsystems führen, was letztendlich zur direkten Lyse des Erregers führt. Dies stellt einen wichtigen Mechanismus bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen dar (Cooper 1985).

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Allergien und im allergischen Asthma spielen das IgE und dessen hochaffiner *Fcε-Rezeptor (FcεRI)* (Ravetch 1994). Der Fcε-Rezeptor I findet sich u.a. auf Mastzellen, und bindet freies IgE, welches wiederum durch Bindung des spezifischen Allergens quervernetzt wird. Diese Quervernetzung von IgE-Fcε-Rezeptor-Komplexen führt zur Aktivierung des Rezeptors und dadurch zur Aktivierung und Degranulation der Mastzelle. Diese sezerniert dabei innerhalb kürzester Zeit toxische Substanzen, welche zur massiven Schädigung des umliegenden Gewebes und zur weiteren lokalen Aktivierung des Immunsystems führen kann.

1.3.2. B-Zell Aktivierung

Die Entwicklung der B-Zelle findet im Knochenmark statt. Unreife B-Zellen verlassen das Knochenmark und reifen in der Peripherie zur naiven B-Zelle aus. Diese Zellen besitzen ein membranständiges Immunglobulinmolekül, den B-Zellrezeptor, einzigartiger Spezifität und zirkulieren im Blut- und Lymphsystem, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Die Aktivierung der B-Zelle findet in sekundären lymphatischen Organen, der Milz, der Lymphknoten und der *mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben (MALT)*, durch Bindung ihres Antigens statt. Dabei ist der Aufbau in allen sekundären lymphatischen Organen vergleichbar. Der Aufbau eines solchen sek. lymphatischen Organs soll im Folgenden kurz anhand der Milz erläutert werden: Die Milz ist von einer straffen Bindegewebskapsel umgeben und besteht aus einer roten und einer weißen Pulpa. In der stark durchbluteten roten Pulpa wird das Blut des Körpers gefiltert und alte Blutkörperchen abgebaut. Dieser Funktion entsprechend beinhaltet sie ein offenes Gefäßsystem und viele gewebsständige Makrophagen. Die rote Pulpa wird aber von Arealen lymphozytären Gewebes durchzogen, der so genannten weißen Pulpa. Die weiße Pulpa ist in ihrem Aufbau dem der Lymphknoten vergleichbar. In ihr sind die Zentralarterien und deren Äste von einer T-Zell reichen Zone, der so genannten *periarteriolar lymphoid sheath (PALS)*-Region umgeben. Entlang der PALS-Zone sind die B-Zellen lokalisiert. Hierbei sind die B-Zellen in definierten Bereichen, den so genannten Follikeln (follikuläre B-Zellen) angeordnet. Entlang der B-Zell und T-Zell Zone werden bei Aktivierung auch die Keimzentren ausgebildet. In der Milz sind die B-Zell und T-Zell Zonen von Blutgefäßen umgeben, welche den Randsinus bilden. Daran schließt sich eine aus wenigen Schichten aufgebaute Marginalzone an, die spezielle Marginalzonen B-Zellen und Makrophagen enthält. Die Marginalzonen B-Zellen stellen mit etwa 5 % nur eine kleine Population aller Zellen in der Milz dar, sind aber ein wichtiger Bestandteil der frühen Abwehr gegen Erreger im Blut. In den Lymphknoten fehlen die Marginalzone und der Randsinus.

Das erste Signal für die Aktivierung bekommen die B- Zellen über die Bindung des Antigens an den B-Zellrezeptor (Gulbranson-Judge and MacLennan 1996; O'Rourke, Tooze et al. 1997). Nach Bindung des Antigens wird das Antigen endocytisiert, prozessiert, anschließend auf ein MHC II-Molekül geladen und auf der Oberfläche präsentiert. Zur vollständigen Aktivierung benötigt die B-Zelle aber weitere Signale. Diese stammen im Fall von thymusabhängigen (TD)- Antigenen von antigenspezifischen T_H2-Zellen (Parker 1993; MacLennan, Gulbranson-Judge et al. 1997) und bei thymusunabhängigen (TI) Antigenen von mikrobiellen Bestandteilen. Nach Aufnahme von TD-Antigenen wandern die B-Zellen

innerhalb der lymphatischen Organe in die T-Zellzone (Garside, Ingulli et al. 1998). Dort treffen sie auf eine ebenfalls Antigen-spezifische und zuvor aktivierte T_H2 -Zelle. Erkennt die T_H2 -Zelle durch ihren T-Zellrezeptor dass an MCH II-gebundene Antigen auf der Oberfläche der B-Zelle, führt dies zusammen mit ko-stimulatorischen Signalen zur vollständigen Aktivierung der B-Zelle. Essentielle ko-stimulatorische Signale sind u.a. die Interaktion der beiden Oberflächenmoleküle *CD40Ligand (CD40L)* auf der T-Zelle und *CD40* auf der B-Zelle. Weiterhin wird die Expression von Zytokinrezeptoren auf der B-Zelle induziert. Diese vollständige Aktivierung der B-Zellen führt zu der Bildung eines primären Focus innerhalb der T-Zellzone. Dabei wird von Seiten der T-Zelle aus als Folge der Interaktionen verschiedene Zytokine produziert, die in der B-Zelle zu starker Proliferation (klonale Expansion) führt. Im Falle der T_H2 -Zellen wird hauptsächlich *Interleukin-4 (IL-4)* und im Falle der T_H1 -Zellen *Interferon- γ (IFN- γ)* produziert (Croft and Swain 1991). Ein Teil der aktivierten B-Zellen bildet anschließend zwei bis drei Tage nach Aktivierung extrafollikuläre Foci, in denen sie weiter proliferieren und zum Antikörper-produzierenden Plasmablasten, und letztendlich zur Bildung der reifen Plasmazelle differenzieren. Die Plasmablasten stellen dabei die noch nicht vollständig differenzierten Vorläufer der Plasmazellen dar. Sie besitzen im Gegensatz zu Plasmazellen noch Proliferationsaktivität. Die terminale Differenzierung zur Plasmazelle geht anschließend mit dem Verlust der Proliferationsaktivität einher. Die entstandenen Plasmazellen sind meist kurzlebig und sezernieren Antikörper des Typs IgG und IgM mit niedriger Affinität. Diese Zellen haben eine 50 %ige Überlebensrate innerhalb der ersten drei Tage und eine ungefähre Lebensdauer von 14 Tagen. Danach sind die extrafollikulären Foci vollständig reduziert. Abhängig von der Aktivierungsart und dem resultierenden Zytokinmilieu kann es zu einem Klassenwechsel des Antikörpers kommen. Dabei führt IL-4 in einer T_H2 -Immunantwort zu einem Klassenwechsel zu IgE (Snapper and Paul 1987; Stavnezer, Guikema et al. 2008). Die T_H2 -spezifische Immunantwort und der Klassenwechsel zu IgE spielt eine entscheidende Rolle bei allergischen Erkrankungen. IFN- γ hingegen begünstigt den Wechsel hin zu IgG Antikörpern.

Ein Teil der aktivierten B-Zellen kann aber einen anderen Differenzierungsweg einschlagen und sich einer so genannten Keimzentrumsreaktion unterziehen. Dabei wandern die aktivierten B-Zellen zusammen mit ihrer spezifischen T-Zelle an den Rand zwischen B-Zell und T-Zellzonen, wo sie Keimzentren bilden. Während der Keimzentrumsreaktion kommt es zu Phasen intensiver klonaler Expansion, deren Folge die Affinitätsreifung des B-Zellrezeptors ist (Kelsoe 1996; MacLennan 2005). Dabei durchlaufen die beteiligten B-Zellen mehrere Stadien wobei es zu einem Klassenwechsel der konstanten Region der schweren

Kette und somatische Hypermutation kommen kann. Die somatischen Hypermutation, das Einfügen von Punktmutationen in die Gene für die variable Regionen der leichten und schweren Ketten, kann dabei eine stark erhöhte Affinität des Antikörpers zur Folge haben. B-Zellen mit Mutationen die sich ungünstig auf die Affinität auswirken, erhalten keine Wachstumssignale von den beteiligten und ebenfalls klonal expandierten T-Zellen und gehen in Apoptose. Dabei konnte kürzlich das pro-apoptotische Protein Bim (*BH3-only protein*) als essentieller Faktor für den Selektionsprozess identifiziert werden (Fischer, Bouillet et al. 2007). B-Zellen mit gesteigerter Affinität hingegen werden durch die Bereitstellung von Überlebenssignalen positiv selektioniert.

B-Zellen der Keimzentrumsreaktion können sich direkt zu Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen ausdifferenzieren (Kosco, Burton et al. 1989; Tew, DiLosa et al. 1992). Diese Plasmazellen sind gekennzeichnet durch die Produktion hochaffiner Antigen-spezifischer Antikörper der Klassen IgG, IgA und IgE. Die B-Gedächtniszellen können bei erneutem Antigenkontakt sehr rasch und effizient aktiviert werden und in Plasmazellen differenzieren. Im Gegensatz zu den Plasmazellen der sekundären Foci zeichnen sich die Plasmazellen der Keimzentrumsreaktion durch eine bevorzugte Wanderung ins Knochenmark und eine sehr hohe Lebensdauer von mehreren Monaten bis Jahren aus (siehe 1.3.3.).

Die Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle geht mit starken morphologischen Veränderungen einher. Es erfolgt eine Größen- und Volumenzunahme sowie die Reduktion des Nukleus. Der größte Teil des Zellvolumens wird vom rauen *endoplasmatischen Retikulum* (ER) eingenommen, entsprechend der Aufgabe der Plasmazelle, Antikörper in großer Anzahl zu produzieren ($\sim 10^4$ Antikörper pro Sekunde). Es entsteht eine ovale Zellform, an deren Rand gedrängt sich der Nukleus befindet. Auch die veränderte Expression von bestimmten Oberflächenproteinen ist eine Folge des Differenzierungsprozesses. Charakteristisch dabei sind die Reduktion der MHC II-Moleküle und des B-Zellrezeptors sowie die starke Expression des Proteoglykans *Syndekan-1* (*CD138*), welches auch als Plasmazellmarker bezeichnet wird (Chen-Kiang 2005). Plasmazellen sind terminal differenzierte, immobile Antikörper-produzierende Zellen, die keinerlei Proliferationsaktivität mehr aufweisen (Nossal 1962). Im Gegensatz dazu besitzt ihr Vorläufer noch Proliferations- und Migrationspotential. Die Aktivierung von B-Zellen durch TI-Antigene erfolgt, im Gegensatz zur oben beschriebenen Aktivierung durch TD-Antigene, polyklonal durch bakterielle Komponenten wie Polysaccharide, polymere Proteine und Lipopolysaccharide, und ist T-Zell unabhängig. Die Mehrheit der entstehenden Plasmazellen sezernieren Antikörper der Klassen IgM und IgG1 mit geringer Affinität. Nur eine Minderheit von ihnen weist eine lange Lebensdauer auf

(Sze, Toellner et al. 2000) (Smith, Hewitson et al. 1996; O'Connor, Gleeson et al. 2003). Die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses in Form von Gedächtniszellen findet nicht statt (O'Connor, Gleeson et al. 2003) .

1.3.3. Lebensspanne von Plasmazellen

Plasmazellen repräsentieren weniger als 1% der Zellen in lymphatischen Organen (Fairfax, Kallies et al. 2008), sind aber für die gesamte Antikörperproduktion verantwortlich. Aufgrund ihrer geringen Anzahl und den damit verbundenen methodischen Restriktionen ist bisher wenig über ihre Biologie bekannt. Ihre Lebensspanne kann einige Tage (short-lived) bis einige Monate oder auch Jahre (long-lived) betragen (Radbruch, Muehlinghaus et al. 2006). Es wird angenommen, dass kurzlebige und langlebige Plasmazellen zwei getrennte Populationen darstellen, und nicht alle Plasmablasten die Kompetenz besitzen, in eine langlebige Plasmazelle auszureifen (Ho, Lortan et al. 1986). Langlebige Plasmazellen sowie B-Gedächtniszellen zeichnen sich durch die Produktion von hochaffinen Antigen-spezifischen Antikörpern und eine lange Lebensdauer aus. Genetische Analysen der Antikörper kodierenden Gene weisen einen Klassenwechsel sowie somatische Hypermutationen auf. Es wird daher angenommen, dass langlebige Plasmazellen überwiegend aus Keimzentrumsreaktionen hervorgehen. In einer primären Immunantwort auf ein TD-Antigen sind Plasmazellen zwar innerhalb weniger Tage nach Immunisierung in sekundären lymphatischen Organen z.B. der Milz nachweisbar. Diese besitzen aber *in situ* nur eine kurze Lebensdauer von wenigen Tagen und sterben (Chen-Kiang 2005).

Die sekundäre Immunantwort dagegen weist viel schneller ein Maximum an Plasmazellen auf. Im Falle des TD-Antigens *Ovalbumin* (OVA) wurde bereits fünf Tage nach Immunisierung das Maximum an Plasmazellen in der Milz von OVA-immunisierten Mäusen nachgewiesen. Dieses sinkt nach sechs bis acht Tagen rasch wieder ab, auf weniger als 5% des Maximums. Im Knochenmark kommt es zu einer massiven Einwanderung von Plasmazellen, welche nach sechs bis sieben Tagen ihr Maximum erreicht hat. Die Plasmazellzahl sinkt anschließend ab, bis nach ca. 14 Tagen ein Plateau erreicht ist (Radbruch, Muehlinghaus et al. 2006). Folglich stirbt in einer sekundären Immunantwort ein großer Teil der in der Milz entstandenen Plasmazellen nach kurzer Zeit am Ort der Entstehung, während ein Teil in das Knochenmark wandert. Während auch hier ca. 80 – 90 % der Zellen sterben, überlebt eine kleine Population und kann noch 120 Tage nach Immunisierung nachgewiesen werden (Manz, Lohning et al. 1998). Diese Plasmazellen

weisen keinerlei Teilungsaktivität mehr auf und produzieren Antigen-spezifische Antikörper hoher Affinität unabhängig vom Antigen. Sie besitzen eine Halbwertszeit von mehreren Monaten und werden folglich als langlebig bezeichnet und bilden ein Teil des immunologischen Gedächtnisses. Langlebige Plasmazellen zeigten sich in mehreren Studien resistent gegenüber Immunsuppressiva (Slifka and Ahmed 1998; Slifka, Antia et al. 1998).

Die langlebigen Plasmazellen zeichnen, im Gegensatz zu kurzlebigen Plasmazellen, für eine kontinuierliche Antikörperproduktion über lange Zeiträume verantwortlich (Manz, Thiel et al. 1997; Manz, Arce et al. 2002). Diese Kontinuität der Antikörperproduktion ist charakteristisch für eine sekundäre Immunantwort.

Für die Einwanderung ins Knochenmark konnte der Chemokinrezeptor *CXCR4* und dessen Ligand *CXCL12/SDF-1* als essentielle Faktoren identifiziert werden (Hargreaves, Hyman et al. 2001; Nie, Waite et al. 2004). SDF-1 wird in der Milz, den Lymphknoten und von den Stromazellen des Knochenmarks produziert. In Mäusen mit *CXCR4*-defiziente B-Zellen konnte eine deutlich verminderte Akkumulation von Plasmazellen im Knochenmark nach Immunisierung nachgewiesen werden. Eine dennoch geringe nachweisbare Einwanderung von Zellen weist auf weitere beteiligte Faktoren neben *CXCR4* hin (Nie, Waite et al. 2004).

Plasmazellen können auch in entzündetem Gewebe gefunden werden. Dabei spielen sie bei der lokalen Bekämpfung eines Erregers durch ihre Antikörperproduktion eine wichtige Rolle. Wird die Infektion geklärt, sterben diese Zellen rasch ab. Aber unter Bedingungen einer chronischen Entzündung können diese Zellen über einen langen Zeitraum überleben (Cassese, Lindenau et al. 2001). Sie werden vermutlich lokal gebildet oder können aus den sekundären lymphatischen Organen, Milz und Lymphknoten, über Chemotaxis aktiv einwandern. Dabei spielen die Chemokine *CXCL9* (*Monokine induced by gamma interferon - MIG*), *10* (*Interferon gamma induced protein - IP-10*) und *11* (*Interferon-inducible T cell-alpha chemoattractant - I-TAC*) und dessen Rezeptor *CXCR3* eine essentielle Rolle (Baggiolini 1998; Muehlinghaus, Cigliano et al. 2005). Die *CXCR3* Expression wird dabei von IFN- γ , eines pro-inflammatorischen Zytokins, induziert. Der entsprechende Rezeptor wird auf der Oberfläche des migratorisch aktiven Plasmablasten exprimiert. Ihre Lebensdauer ist abhängig von den Bedingungen, den Überlebensnischen, der Entzündungsreaktion (siehe 1.3.3.). Solche Plasmazellen konnten in den Nieren von Patienten mit systemischen Lupus Erythematosus und in der Synovial von rheumatoiden Arthritis-Patienten über lange Zeit nachgewiesen werden (Schroder, Greiner et al. 1996; Hutloff, Buchner et al. 2004; Tsubaki, Takegawa et al. 2005). Antikörper, die von diesen produziert werden, sind maßgeblich an der Pathogenese der Erkrankungen beteiligt.

Langlebige IgE-sezernierende Plasmazellen könnten auch einen erheblichen Einfluss auf die Ausprägung von IgE-vermittelten Allergien und deren chronischen Manifestationen in den Atemwegen, dem allergischen Asthma bronchiale, haben. Ein über lange Zeit nachweisbarer, Allergen-spezifischer IgE-Spiegel im Serum von Allergikern zusammen mit der nur geringen Halbwertszeit von IgE (12h in der Maus; 3 Tage im Menschen), geben erste Hinweise auf die Beteiligung von langlebigen Plasmazellen bei der Ausbildung eines kontinuierlichen Allergen-spezifischen IgE-Spiegels. Holt und Kollegen zeigten erstmals, dass IgE-sezernierende Zellen, aber nicht B-Gedächtniszellen, in Nagern die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen überlebten und noch nach einem Jahr nachweisbar waren (Holt, Sedgwick et al. 1984). Der eventuelle Einfluss einer humoralen Gedächtnisantwort gegen Allergene auf die Chronizität ist bisher ungeklärt. Die Herkunft und Dynamik der Plasmazellen der humoralen Immunantwort wird in Abbildung 2 zusammengefasst.

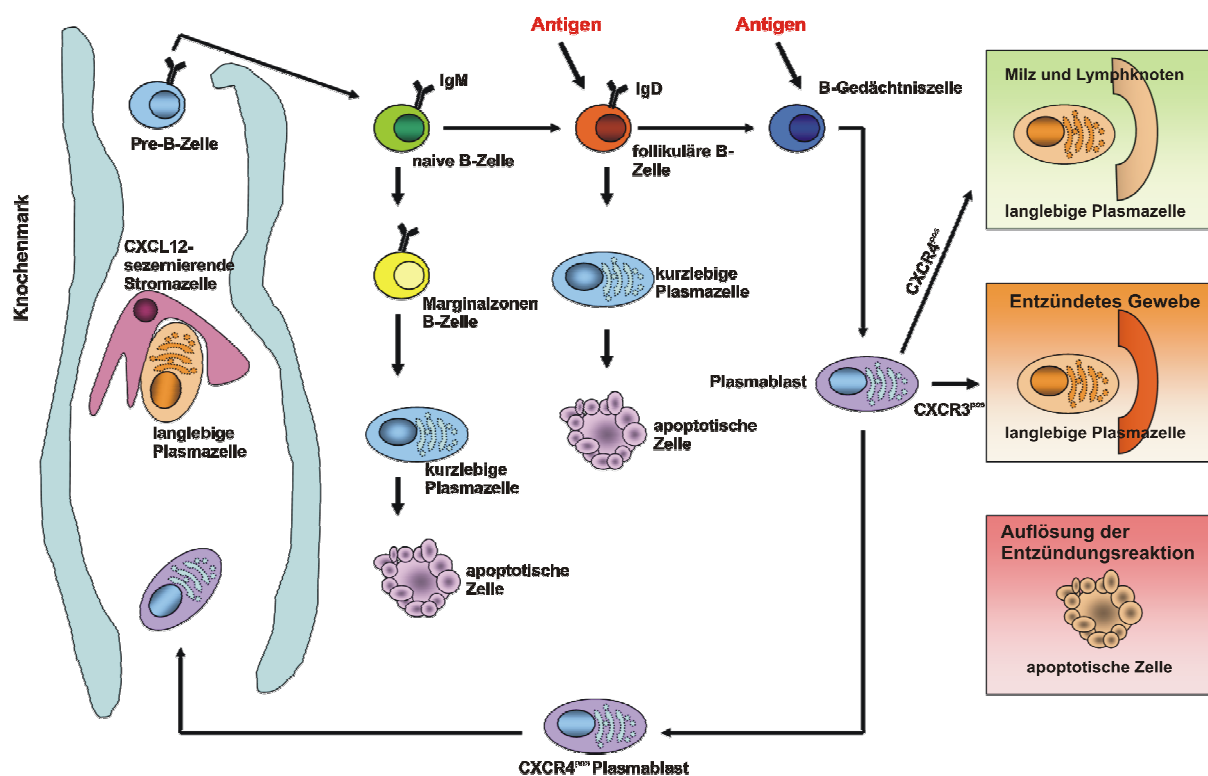


Abb.2.: Dynamik der Plasmazellen in der humoralen Immunantwort (modifiziert nach Radbruch et al., 2006). Gezeigt wird die Entstehung der verschiedenen Plasmazellpopulationen beginnend mit der pre-B-Zelle im Knochenmark. Spätere Reifung dieser Zellen zu naiven bzw. marginalen oder follikulären B-Zellen führen nach Aktivierung durch ein suszeptibles Antigen zur Bildung von kurzlebigen Plasmazellen. Alternative Aktivierung der follikulären B-Zellen durch T-Helferzellen führt zur Bildung von B-Gedächtniszellen. Diese Zellen sind langlebig und produzieren Antikörper die einen Klassenwechsel vollzogen haben und hochaffin gegenüber ihrem Antigen sind. Eine Reaktivierung dieser Zellen führt zur Bildung von kompetenten Plasmablasten die zu langlebigen Plasmazellen ausreifen können. Der kleinere Teil der Plasmablasten verbleibt am Ort ihrer Entstehung, den lymphoiden Organen (Milz oder Lymphknoten), während der Hauptteil

in entzündete Gewebe oder dem Knochenmark wandern. Dies geschieht unter Einfluss von spezifischen Chemokinen bzw. deren Rezeptoren. Alle drei Gewebearten besitzen aber eine begrenzte Anzahl an Überlebensnischen. Plasmablasten welche in der Lage sind eine solche Nische erfolgreich zu besetzen, differenziert sich in eine Plasmazelle und verlieren ihr migratorisches Potential. Auflösung der Entzündung führt zum Verlust der Überlebensnischen und der residenten Plasmazellen. Im Knochenmark und zu einem kleineren Anteil in den sekundären Lymphorganen können langlebige Plasmazellen überleben und bilden ein humorales Gedächtnis.

1.3.4. Konzept der Überlebensnische

Langlebige Plasmazellen sind in der Lage, über Monate im Knochenmark zu überleben. Die Isolation dieser Zellen aber führt zu einem Absterben der Zellen innerhalb von sieben Tagen. Dies gilt ebenso für *in vitro* generierten Plasmazellen (Cassese, Arce et al. 2003). Diese Beobachtungen führten zu der Theorie, dass ein verlängertes Überleben von Plasmazellen abhängig von spezifischen Signalen in ihrer Umgebung, z.B. im Knochenmark, ist, die in ihrer Gesamtheit eine so genannte Überlebensnische bilden. Dies setzt voraus, dass diese Zellen in der Lage sein müssen auf diese Signale zu reagieren. In diesem Zusammenhang konnte der Transkriptionsfaktors *B-lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp1)* als ein essentieller Faktor identifiziert werden. Nach konditionaler Inaktivierung von *PR Domain containing 1 (Prdm1/Blimp1)* in Mäusen verschwanden die langlebigen Plasmazellen aus dem Knochenmark. Damit einher ging ein starker Abfall der Serumantikörper (Shapiro-Shelef, Lin et al. 2005). Blimp1 erhöht u.a. die Expression des Transkriptionsfaktors *X-box binding protein 1 (XBP1)*, welcher in seiner aktiven Form die *Unfolded-Protein Response (UPR)* induziert, ein Mechanismus, welcher durch ungefaltete Proteine verursachten Stress im ER reduziert, und dadurch die Apoptose verhindern kann. Dieser ER Stress kann durch eine massive Proteinproduktion z.B. bei der Produktion von Antikörpern ausgelöst werden (Iwakoshi, Lee et al. 2003; Shaffer, Shapiro-Shelef et al. 2004; Shapiro-Shelef, Lin et al. 2005). Dieser Prozess scheint generell eine bedeutende Rolle in sekretorischen Zellen zu spielen. So führte die Inhibition von XBP1 in Plasmazytomzellen zu ER Stress-induzierter Apoptose (Lee, Iwakoshi et al. 2003). Die genaue Rolle von XBP1 für das Überleben von Plasmazellen ist bisher aber ungeklärt. Ein weiterer Faktor ist Aiolos, ein Transkriptionsfaktor, welcher u.a. bei epigenetischen Prozessen wie dem Chromatinremodelling eine Rolle spielt. Aiolos-defiziente B-Zellen, können sich nicht in langlebige Plasmazellen differenzieren (Cortes and Georgopoulos 2004).

Für das Überleben im Knochenmark konnten bisher verschiedene Signale identifiziert werden. Nach Zugabe von *Interleukin-6 (IL-6)*, *Interleukin-5 (IL-5)*, *Tumornekrosefaktor- λ*

(*TNF- λ*), SDF-1 sowie *B cell activating factor (BAFF)* und *a proliferation inducing ligand (APRIL)* zu isolierten Plasmazellen des Knochenmarks überlebte ein Teil der Zellen bis zu sieben Tage. In unbehandelten Kulturen waren schon nach maximal drei Tagen keine Zellen mehr nachweisbar. Dabei wiesen synergistische Effekte verschiedener Faktoren das stärkste Überleben auf (Cassese, Arce et al. 2003).

Über den genauen Aufbau der Überlebensnischen *in vivo* ist bisher nur wenig bekannt. Es ist aber nahe liegend, dass ein Teil der aufgeführten Faktoren auch *in vivo* von Bedeutung sind. Dabei spielen sowohl lösliche Faktoren sowie Signale über Zell-Zellkontakte eine Rolle. Stromazellen im Knochenmark produzieren SDF-1 und exprimieren gleichzeitig das Adhäsionsmolekül *vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1/CD106)*. Dabei stehen ca. 90 % der IgG⁺ Plasmazellen in engen Kontakt mit den Stromazellen und exprimieren den VCAM-1 Liganden, das Integrin *very late antigen, $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)* (Harada, Kawano et al. 1993; Tokoyoda, Egawa et al. 2004). Ko-Kulturexperimente mit Stroma- und Plasmazellen unter Zugabe eines neutralisierenden anti- VLA-4 Antikörper zeigten eine deutliche Reduktion der Antikörperspiegel im Überstand (Minges Wols, Underhill et al. 2002). Die Anzahl der Überlebensnischen *in vivo* ist allerdings begrenzt. Da die Plasmazellpopulation eines gesunden Menschen max. 1% der Gesamtzellpopulation ausmacht (Terstappen, Johnsen et al. 1990), wir aber ständig Erregern aus der Umgebung ausgesetzt sind, könnte somit ein neu gebildeter mobiler Plasmablast mit einer immobilen Plasmazelle um eine Nische konkurrieren. Arbeiten von Odenthal und Kollegen stützen diese Theorie. Sie konnten zeigen, dass sechs bis sieben Tage nach einer Tetanus-Aufrischungsimpfung Tetanus-spezifische HLA-DR(MHC II)⁺ Plasmablasten zusammen mit nicht-Tetanus-spezifischen HLA-DR (MHC II)⁻ Plasmazellen im Blut nachweisbar sind (Odendahl, Mei et al. 2005). Dabei sind letztere vermutlich ehemals Knochenmarksresidente Plasmazellen, die von den ins Knochenmark eingewanderten Tetanus-spezifischen Plasmablasten verdrängt wurden. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind aber nicht bekannt.

Überlebensnischen bieten auch entzündliche Gewebe (Cassese, Lindenau et al. 2001). Diese sind jedoch nicht genauer charakterisiert. Viele der bisher identifizierten Überlebensfaktoren zählen zu den entzündlichen Zytokinen und werden dort auch lokal produziert. Beispiele sind das IL-6 , TNF- α und BAFF (Hirano and Kishimoto 1989; O'Connor, Raman et al. 2004; Schneider 2005). Klärung der Entzündung führt ebenso zum Verlust der Überlebensnische und somit zum Tod der lokalen Plasmazellen. Im chronisch entzündeten Gewebe können die Überlebensnischen entsprechend stabil sein, was zu einer kontinuierlichen, lokalen

Produktion von Antikörpern führt. Die Existenz von Überlebensnischen in anderen Geweben wie z.B. in der Darm-assoziierten Mukosa, ist bisher nicht bekannt.

1.4. Allergie und allergisches Asthma bronchiale

Grundlage von allergischen Reaktionen ist die Produktion von Allergen-spezifischen IgE Antikörpern gegen verbreitete, normalerweise harmlose Antigene. Diese sind kleine Antigene, die meist in geringer Dosis über die Schleimhäute eindringen und im Körper über eine T_H2 -vermittelte Immunantwort (Cohn, Elias et al. 2004) die Produktion von IgE auslösen. Zu diesen Allergenen zählen vor allem Aeroallergene wie Birken- und Gräserpollen und Hausstaubmilbenkot (Romanet-Manent, Charpin et al. 2002). Kommt es in Folge von genetischen Prädispositionen und weiteren Faktoren zur Ausbildung einer chronischen Entzündung der Atemwege, deren Symptomatik Atemnot und Atemwegsüberempfindlichkeit beinhaltet, spricht man von einem allergischen Asthma bronchiale (Zhu, Homer et al. 1999). Die Prävalenz des Asthma bronchiale ist in den letzten 20 Jahren vor allem in den Industrieländern stark angestiegen. In Europa liegt sie bei durchschnittlichen 8,6 % (European Lung White Book, 2003), wobei epidemiologische Studien ein deutliches Gefälle zwischen den westeuropäischen und osteuropäischen Staaten aufzeigen. Weltweit sind so ca. 155 Millionen Menschen vom allergischen Asthma bronchiale betroffen (Asher, Keil et al. 1995).

1.4.1. Pathophysiologie

Das Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, an dessen Entstehung Zellen des adaptiven Immunsystems essentiell beteiligt sind. Ursachen für die Atemwegsentszündung können neben den Allergenen auch virale Infekte sein (Busse and Gern 1997). Dabei verursacht die allergische Entzündung immer wiederkehrende Anfälle von Atemnot und Husten (WHO workshop report, 1995), die typischerweise mit einer anfallsweise auftretenden Atemwegsobstruktion einhergehen. Diese beruht auf der Fähigkeit der kleineren und mittleren Atemwege, auf unspezifische Reize wie kalte Luft oder Zigarettenrauch mit einer Konstriktion der glatten Muskulatur zu reagieren. Die allergische bzw. asthmatische Entzündungsreaktion ist eine Hypersensibilitätsreaktion des Typ1 und wird in eine frühe und späte Phase unterteilt.

Die frühe Phase der Reaktion wird durch die Aktivierung von Immunzellen, durch Allergenkontakt induziert. Dabei erfolgt über die Bindung des Allergen an IgE / Fcε-

Rezeptor-Komplexe die Aktivierung von Makrophagen und Mastzellen (Tonnel, Joseph et al. 1983). Nach Aktivierung sezernieren diese Zellen pro-inflammatorische Mediatoren wie Histamin (Jarjour, Calhoun et al. 1997), Eicosanoide und reaktive Sauerstoffprodukte in hoher Konzentration (Wenzel, Fowler et al. 1988). Diese führt zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur und zu einer gesteigerten Mukusproduktion. Zusätzlich werden ebenso pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine sezerniert, die für die späte Phase der Reaktion essentiell sind.

Die Spätphasereaktion folgt ca. sechs bis neun Stunden nach Allergenkontakt. Hierbei findet eine Infiltration und Aktivierung Allergen-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen, eosinophiler und basophiler Granulozyten in die Lunge statt (Bousquet, Jeffery et al. 2000). Dabei ist die Sekretion von Zytokinen durch Mastzellen ein entscheidender Faktor für die anhaltende Beteiligung der T_H2 -Zellen. Bereits 24 Stunden nach erstem Allergenkontakt konnte die Produktion der Zytokine *Interleukin-2 (IL-2)*, IL-5 und von *Granulocyte Makrophage Colony Stimulating Factor (GM-SF)* durch T-Zellen in Lungenbiopsien von Patienten nachgewiesen werden (Bentley, Meng et al. 1993).

1.4.2. Immunpathogenese

Als Folgen der chronisch allergischen Atemwegsentzündung lassen sich eine Schädigung des Atemwegsepithels und eine verstärkte Ablagerung kollagener Fasern in die Atemwegswand, verbunden mit einer massiven Infiltration von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten in die Atemwege, nachweisen. Dabei zeigten epidemiologische und klinische Studien, dass sowohl der Schweregrad sowie die initiale und anhaltende Reaktion mit der Anwesenheit Allergen-spezifischer IgE Antikörper korreliert. Die humorale Immunantwort spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Chronifizierung der allergischen Atemwegsentzündung. Nach Inhalation des Allergens, wird dieses zunächst von lokalen DCs (dendritische Zellen) der Atemwege aufgenommen, prozessiert und T-Zellen sowie B-Zellen in den nahe liegenden drainierenden Lymphknoten präsentiert. Daraufhin erfolgt die Aktivierung und Differenzierung der B- und T-Zellen zu Plasma- bzw. $CD4^+$ T_H2 -Zellen (siehe 1.3.2.). Die Produktion von IL-4 und *Interleukin-13 (IL-13)* durch T_H2 -Zellen (Wills-Karp, Luyimbazi et al. 1998) bedingt bei den B-Zellen einen Antikörper-Klassenwechsel hin zu IgE. Inwiefern die B- bzw. T-Zellaktivierung und deren Differenzierung lokal in der Lunge stattfinden kann, ist bisher unklar. Nach Sezernierung der IgE-Antikörper binden diese an die $Fc\epsilon$ -Rezeptoren auf den Oberflächen von Mastzellen und basophilen Granulozyten. Nach

erneutem Allergenkontakt führt dies wie in 1.3.1. beschrieben zur Aktivierung und Degranulation dieser Zellen. Die T_H2 Zellen spielen durch die Produktion von Zytokinen wie z.B. IL-4, IL-5, IL-13 und GM-CSF eine entscheidende Rolle bei der Initiierung der humoralen Immunantwort, der Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung und deren Folgen. Dabei wird das allergische Asthma bronchiale als ein Resultat einer T_H2 -dominierten Immunantwort gesehen. So lassen sich zum Beispiel in der bronchoalveolären Lavage (BAL) Flüssigkeit von Asthmapatienten im Vergleich zu gesunden Individuen hohe Konzentrationen von IL-5 und IL-4 mRNA nachweisen.

Neben den T_H2 Zellen und den B-Zellen wandern auch eosinophile Granulozyten in großer Zahl in die Atemwege ein. Reife eosinophile Granulozyten besitzen einen hohen Gehalt an Granula im Zytoplasma, welche potentiell proinflammatorische Proteine, Peroxidasen und kationische Proteine enthalten. Ein Marker für eosinophile Granulozyten sind das *Major basic protein (MBP)* sowie das *Eosinophil-derived Neurotoxin (EDN)*. Diese Moleküle bewirken zusammen mit sezernierten Leukotrienen die massive Schädigung des umliegenden Gewebes, eine gesteigerte Gefäßpermeabilität und eine weitere Infiltration von eosinophilen Granulozyten (Rothenberg 1998). Ein für die Migration essentieller Rezeptor der eosinophilen Granulozyten ist der *CCR3*-Rezeptor (Ying, Robinson et al. 1997). Dessen Liganden, die Chemokine *RANTES (CCL5)*, *Macrophage Inflammatory Protein-1 (MIP)*, *Macrophage Chemoattractant Protein-2-4 (MCP-2-4)* sowie die *Eotaxine 1-3* werden von nahezu allen Zellen der Atemwege selbst produziert und lassen sich in erhöhter Konzentration in Lungenbiopsien und BAL-Flüssigkeiten von Patienten nachweisen (Holgate, Bodey et al. 1997). In einer *CCR3*-defizienten Maus ist es nicht möglich, eine allergische Atemwegsentzündung zu induzieren (Ma, Bryce et al. 2002).

Die chronische allergische Atemwegsentzündung ist ein komplexer Prozess, der über die Infiltration von eosinophilen Granulozyten und T-Zellen hinausgeht. Alle Zellen der Atemwege, strukturelle wie Immunzellen, werden während des Prozesses aktiviert und bilden ein komplexes Netzwerk von Signalen. Dadurch entsteht als ein Charakteristikum des Asthma bronchiale die strukturelle Veränderung der Atemwege, das so genannte Airway Remodelling (Jeffery 2004). Dieser Vorgang wird als eine Art Wundheilungsprozess verstanden, die zur Wiederherstellung des verletzten Gewebes aufgrund des chronischen Entzündungsprozesses dienen soll. Zu den Folgen dieses Wiederherstellungsprozesses zählen eine Verdickung der Atemwegswand, eine subepitheliale Fibrose, eine erhöhte Mukussekretion, ein verstärktes Auftreten mukusproduzierender Becherzellen, eine Hyperplasie von Myofibrozyten sowie eine Hypertrophie der Atemwegsepithelzellen (Bousquet, Jeffery et al. 2000). Somit zeigen

Asthmapatienten verglichen mit gesunden Individuen eine 10-100 % größere Masse der Atemwege auf. Diese kann bei schweren Asthmafällen zu einer auf 50-300% vergrößerten Masse führen (Jeffery 2001). Im Rahmen der subepithelialen Fibrose kommt es zu einer verstärkten Ablagerung von Kollagenfasern I, II und III. Dies alles zusammen trägt zu einer Verdickung der Atemwegswand bei. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher nicht im Detail verstanden. Dabei scheinen aber die anti-inflammatorischen und pro-fibrotischen Zytokine der *Transforming Growth Factors (TGF)*- Familie eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese werden in erhöhter Konzentration von eosinophilen Granulozyten und Fibroblasten gebildet und können in erhöhter Menge in der BAL-Flüssigkeit von Patienten nachgewiesen werden (Elias, Zhu et al. 1999).

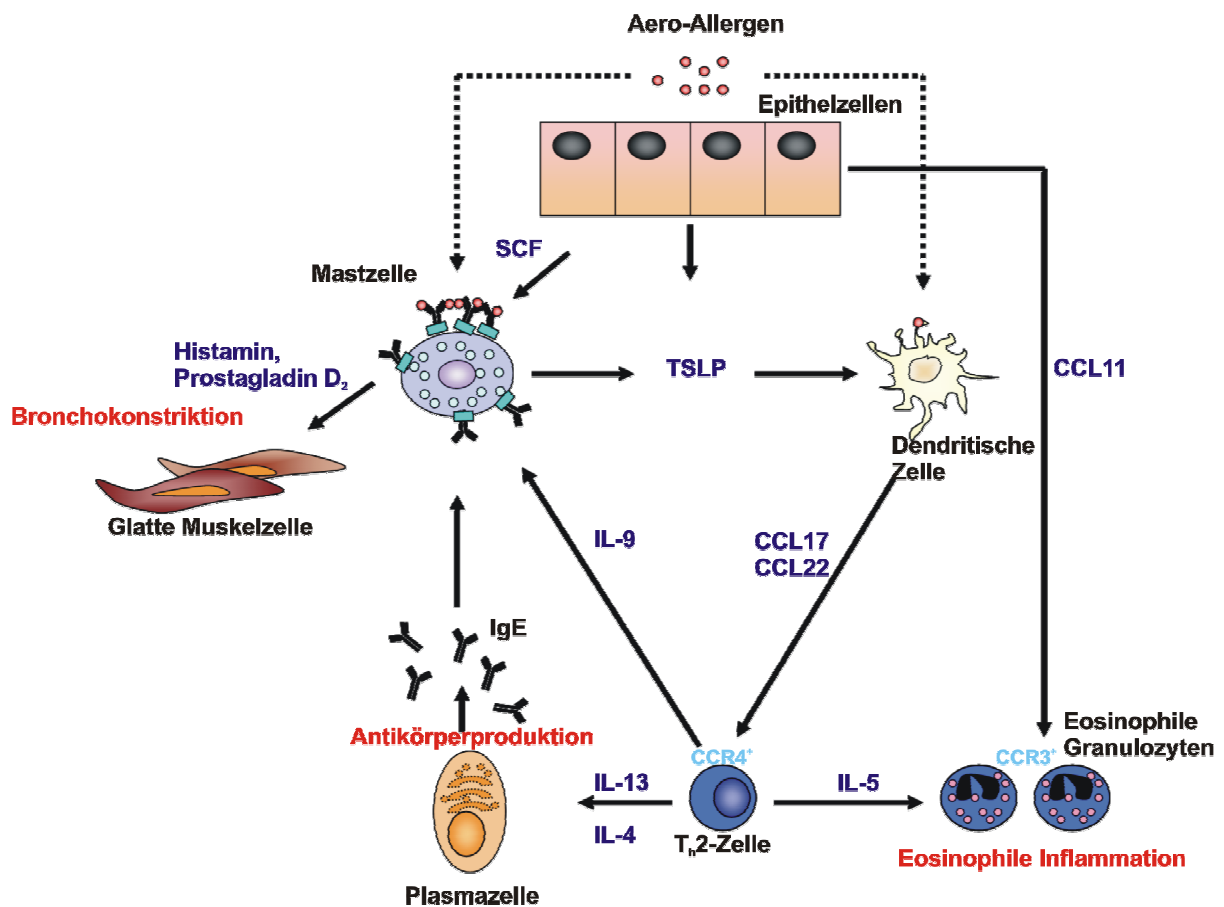


Abb. 4: Entzündungszellen der allergischen Atemwegeentzündung im Asthma (modifiziert nach Barnes et al., 2008). Inhalede Allergene aktivieren sensibilisierte Mastzellen über die Quervernetzung Oberflächen-gebundener IgE-Moleküle. Die aktivierten Mastzellen sezernieren daraufhin verschiedene Mediatoren der Bronchokonstriktion wie Cysteinyl-Leukotriene und Prostaglandin D₂. Epithelzellen sezernieren SCF (*stem-cell factor*), welcher die Mastzellen an der Atemwegsoberfläche hält. Die Prozessierung der Allergene erfolgt über myeloide dendritische Zellen über TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*) Epithel- und Mastzellen. Die myeloiden dendritischen Zellen sezernieren daraufhin die Chemokine CCL17 und CCL22. Diese sind in der Lage, über die Bindung an ihren Rezeptor CCR4 (CC-chemokine receptor 4) TH₂-

Zellen anzulocken. TH₂-Zellen nehmen eine zentrale Rolle in der Regulierung des Entzündungsprozesses der Allergie ein über die Bildung von IL-4, IL-13 (stimuliert den Klassenwechsel zu IgE in B-Zellen), IL-5 (essentiell für die eosinophile Entzündungsreaktion) und IL-9 (stimuliert Mastzellproliferation). Epithelzellen rekrutieren eosinophilen Granulozyten über die Sekretion von CCL11, der Ligand des CCR3-Rezeptors. Asthmapatienten besitzen einen Defekt in regulatorischen T-Zellen (T_{reg}-Zellen), was wiederum die TH₂-Zellproliferation zusätzlich fördern könnte.

1.4.3. Neurotrophine

Innerhalb des Asthma bronchiale konnte eine Gruppe von Proteinen, die Neurotrophine, mit der Ausprägung der allergischen Atemwegsentzündung sowie mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert werden. Diese ursprünglich als Wachstumsfaktoren für Neuronen identifizierten Proteine werden in erhöhter Konzentration während des Entzündungsprozesses von den lokalen Immun- und Strukturzellen produziert. Zu der Gruppe der Neurotrophine gehören unter anderem der *Nerve Growth Factor (NGF)*, der *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* und die *Neurotrophine -3 (NT3)*, *-4 (NT4)* und *5 (NT5)*. Alle Neurotrophine werden initial als unreife, so genannte Pro-Neurotrophine gebildet, welche anschließend durch die intrazellulären Prokonvertasen oder durch Furin gespalten werden (Mowla, Farhadi et al. 2001). Die so entstandenen reifen Proteine besitzen eine Größe von ca. 12 kDa und bilden stabile, nicht-kovalente Dimere. Neurotrophine dienen als spezifische Liganden für verschiedene Rezeptoren, die *Tropomyosin-related Kinases (Trk)* bzw. den *p75-Rezeptor* aus (siehe Abb. 3). Dabei weisen die verschiedenen Neurotrophine eine erhöhte Spezifität zu einzelnen Trk-Rezeptoren auf. So bindet das NGF spezifisch an TrkA, BDNF und NT4 an TrkB und Neurotrophin-3 an TrkC. Alle Neurotrophine binden mit geringer Affinität an den p75-Rezeptor (Dechant, Biffo et al. 1993; Mahadeo, Kaplan et al. 1994; Schropel, von Schack et al. 1995). Dieses der Familie der TNF-Rezeptoren zugehörige Protein, kann dabei auch als Ko-Rezeptor für die Trk-Rezeptoren dienen. Dabei wird die Affinität der Neurotrophinbindung des jeweiligen Trk-Rezeptors und somit dessen Spezifität erhöht (Hempstead, Martin-Zanca et al. 1991; Benedetti, Levi et al. 1993; Bibel, Hoppe et al. 1999). NGF-stimulierte TrkA- und p75-Rezeptoren induzieren unterschiedliche Signalwege innerhalb der Zellen (Kaplan and Miller 2000; Patapoutian and Reichardt 2001; Hempstead 2002). Bindung des Neurotrophins an den jeweiligen Trk-Rezeptor führt zur Dimerisierung und anschließender Autophosphorylierung der Rezeptoren und über das *Src homologous and collagen-like (Shc)* -Adaptorprotein zur Induktion von zwei möglichen Signalkaskaden. *In vitro* Studien an Neuronen führten zur Aufklärung der aktivierten Signalwege und deren Funktion. So führt eine Aktivierung der *Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)* sowie die Aktivierung von *Akt (Proteinkinase B)* zum verstärkten Überleben von Neuronen. Der zweite

Signalweg umfasst die Aktivierung von *Rat sarcoma (Ras)* und der *extracellular signal-regulated kinases (ERK)*. Dieser Signalweg induziert so z.B. des *cyclic AMP-response element binding (CREB)*-Transkriptionsfaktors. CREB-Aktivierung ist mit einem verstärktem Überleben, Wachstum und Proliferation von Neuronen sowie der neuronalen Plastizität verbunden. Die Aktivierung der Trk-Rezeptoren kann aber auch zur Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC- γ) und damit verbundener Signale wie z.B. die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führen (Chao 2003).

Die Aktivierung des p75-Rezeptors führt, vermittelt von unterschiedlichen Adaptorproteinen, zu einer Aktivierung der *Jun N-terminal kinase (JNK)*, zur Aktivierung von NF-kappaB und zur erhöhten Produktion von Ceramiden ((Roux and Barker 2002). Die Aktivierung des p75-Rezeptors durch NGF wird hauptsächlich mit einer Induktion der Apoptose verbunden welche mit einer verstärkten Aktivität von *Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac)* und JNK assoziiert ist (Majdan and Miller 1999; Hempstead 2002). Diese Funktion wird ebenfalls innerhalb von Entzündungsprozessen beobachtet (Dowling, Ming et al. 1999; Roux, Colicos et al. 1999). Aber auch andere zelluläre Vorgänge wie z.B. die Vermittlung von Überlebenssignalen oder Proliferation ist mit der Aktivierung des p75-Rezeptors assoziiert (DeFreitas, McQuillen et al. 2001; Khursigara, Bertin et al. 2001). Insgesamt betrachtet besitzt der p75-Rezeptor eine höhere Affinität zu Pro-Neurotrophinen (Lee, Kermani et al. 2001; Beattie, Harrington et al. 2002) verglichen mit den Trk-Rezeptoren, die eine starke Affinität zu murenen Neurotrophinen aufweisen.

Die Bedeutung der Neurotrophine innerhalb des allergischen Asthma bronchiale ist nahezu ungeklärt. Im Fokus steht das Neurotrophin NGF. Es ist in stark erhöhter Konzentration sowohl im Serum (Bonini, Lambiase et al. 1996) als auch lokal in der bronchoalveolären Lavage (BAL) erkrankter Menschen nachweisbar (Virchow, Julius et al. 1998). Die verstärkte, lokale NGF-Produktion innerhalb der allergischen Atemwegsentzündung lässt sich auch im Tiermodell beobachten (Braun, Appel et al. 1998; Braun, Lommatzsch et al. 1999; Kerzel, Path et al. 2003). Die Neurotrophine, insbesondere NGF, werden dabei von den lokalen Strukturen, wie den Atemwegsepithelzellen als auch von den lokalen Immunzellen (T-Zellen, Mastzellen) produziert (siehe 4.2.1) (Renz 2001; Rochlitzer, Nassenstein et al. 2006). Die Wirkung der Neurotrophine auf die Zellen des Immunsystems innerhalb der allergischen Atemwegsentzündung ist ebenfalls nur bedingt charakterisiert. So ermöglichen Neurotrophine das Überleben humaner bzw. muriner eosinophiler Granulozyten der Atemwege (Nassenstein, Braun et al. 2003; Hahn, Islamian et al. 2006). Auch führt NGF zu einer Amplifikation der bestehenden T_H2-Dysregulation über eine verstärkte Produktion von

IL-4 und IL-5 sowie IgE (Braun, Appel et al. 1998). In früheren Studien konnte zudem die Wirkung von NGF auf kultivierte, humane Lungenfibroblasten beobachtet werden. So führte eine NGF-Behandlung der Zellen zu einer erhöhten Kollagenproduktion sowie zur Differenzierung in Myofibroblasten (Micera, Vigneti et al. 2001). Diese Vorgänge sind ursächlich für das „Airway Remodelling“, welches zu einer massiven Beeinträchtigung der Lungenfunktion führt. Inwiefern die Neurotrophine diesen Prozess verstärken bzw. induzieren, ist Gegenstand intensiver Forschung.

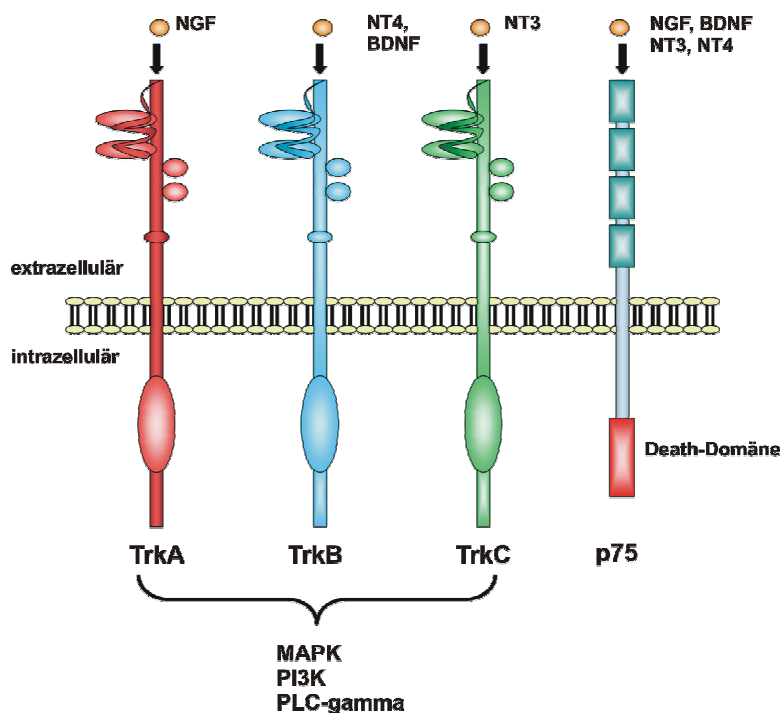


Abb. 3. Neurotrophine und ihre Rezeptoren (modifiziert nach Chao M., 2003). Jedes Neurotrophin bindet einen spezifischen Rezeptor, wohingegen alle Neurotrophine an den p75-Rezeptor binden können. Trk-Rezeptoren besitzen extrazelluläre Immunglobulin G (IgG) Domänen und intrazellulär eine katalytische Tyrosinkinase-Sequenz. Jeder Rezeptor aktiviert verschiedene Signalwege. Die extrazelluläre Domäne des p75-Rezeptors besitzt vier Cystein-reiche Repeats. Der intrazelluläre Rezeptorteil besitzt eine Death-Domäne. Die Bindung der Neurotrophine kann u.a. Überleben, Zellmigration und Myelination über verschiedene Signalwege induzieren. BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*; JNK, *Jun N-terminal kinase*; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; NGF, *nerve growth factor*; NT, *neurotrophin*; PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*; PLC- γ , *phospholipaseC γ* .

1.4.4. Tiermodell des allergischen Asthma bronchiale

Tierexperimentelle Untersuchungen des allergischen Asthmas haben in den letzten Jahren wichtige Erkenntnisse über die Grundlagen dieser Erkrankung erbracht. Dabei wird in den etablierten Modellen die Hausmaus (*Mus musculus*) als Versuchstier verwendet. Die Basis der Modelle ist die Induktion einer Allergen-spezifischen T_H2-Immunantwort in der Maus gegen

ein artfremdes Protein. Dafür werden die Tiere zunächst systemisch gegen das Protein immunisiert. Am häufigsten wird dabei das aviäre Protein OVA verwendet. Die systemische Immunisierung erfolgt hierbei durch die intra-peritoneale (i.p.) Verabreichung des an das Adjuvanz Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$) adsorbierte Proteins (Jungsuwadee, Dekan et al. 2004). Eine daran anschließende Inhalation des Allergens führt zu einer lokalen $\text{T}_\text{H}2$ Immunantwort gegen das Allergen in der Lunge. In Mäusen ohne systemische Sensibilisierung gegen das Allergen hat die anschließende Inhalation hingegen keine Auswirkungen (Sedgwick and Holt 1985). Es wird vermutet, dass durch die systemische Sensibilisierung eine Population von $\text{T}_\text{H}2$ Zellen in der Lunge erzeugt wird, welche für die Induktion der allergischen Atemwegsentzündung essentiell zu sein scheint. So kann in unsensibilisierten Mäusen durch die Proteininhalation eine Atemwegsentzündung induziert werden, wenn zuvor aktivierte Allergen-spezifische $\text{T}_\text{H}2$ Zellen durch einen adoptiven Zelltransfer in das Tier übertragen wurden (Hogan, Koskinen et al. 1998).

Nach erfolgter Sensibilisierung gegen OVA und anschließender Inhalation von OVA-Aerosol kommt es zur Ausprägung einer OVA-spezifischen Immunantwort im Tier und einer allergischen Atemwegsentzündung in der Lunge. Dafür reicht allerdings eine einmalige OVA-Aerosol Inhalation nicht aus, sondern, aus bisher unbekannten Gründen sind wiederholte Antigenexpositionen notwendig. Wird die Exposition beendet kommt es innerhalb kurzer Zeit zu einer drastischen Reduktion der Atemwegsentzündung. Die oben beschriebenen Immunisierungsreaktionen führen zunächst zu einer massiven Allergen-spezifischen IgE und IgG1 Produktion im Tier (Holt, Rose et al. 1981). Dabei sind die IgG1 Titer um ein vielfaches höher im Vergleich zu IgE. Dabei spielen die IgE-vermittelte Mastzelldegranulation und die sezernierten Mediatoren eine bedeutende Rolle innerhalb des experimentellen Asthmas der Maus (Brewer, Kisselgof et al. 1999). Ebenso kommt es zu einer massiven zellulären Infiltration in die Lunge, wobei 70-80% des Infiltrats von eosinophilen Granulozyten gebildet werden (Jungsuwadee, Dekan et al. 2002). Dabei korreliert die Menge an infiltrierenden Zellen des broncho-alveolären Lumens mit dem Ausmaß der Entzündung. Daneben kann man eine gesteigerte Mukusproduktion und die Ausprägung der Atemwegsüberempfindlichkeit beobachten (Dohi, Tsukamoto et al. 1999; Whitehead, Walker et al. 2003). Bei einer chronischen Exposition des Allergens, das chronische Asthmadmodell, kann es ebenfalls, neben der charakteristischen Atemwegsentzündung, zu der Ausbildung des oben beschriebenen Atemwegsumbaus mit den Charakteristika der subepithelialen Fibrose, Becherzellhyperplasie und der Hyperplasie der glatten Atemwege kommen (Wegmann, Fehrenbach et al. 2005).

Zielsetzung

Die Produktion von Allergen-spezifischen Antikörpern spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Allergie und des allergischen Asthma bronchiale. Eine kontinuierliche Produktion von Allergen-spezifischen Antikörpern durch lokale Plasmazellen in den Atemwegen könnte somit maßgeblich zu der Persistenz der Atemwegsentzündung und deren langzeitlichen Auswirkungen führen. Über die Biologie von Plasmazellen in der Allergie und im allergischen Asthma ist bisher nur sehr wenig bekannt. Im Mausmodell des allergischen Asthmas konnten bisher Plasmazellen lokal im inflammatorischen Infiltrat nachgewiesen werden. Inwiefern aber die Präsenz dieser Zellen von der Entzündungsreaktion abhängig ist bzw. welche Faktoren an der Homöostase der Zellen beteiligt sind, ist nicht bekannt. Charakteristische Marker der allergischen Atemwegsentzündung sind u.a. die Neurotrophine. Diese Proteine wurden ursprünglich als essentielle Faktoren für die Entwicklung von Nervenzellen identifiziert, konnten aber auch mit einer Vielzahl anderer biologischer Prozesse in Verbindung gebracht werden. Ein charakteristischer Vertreter ist dabei das NGF. Neurotrophine, insbesondere NGF, werden verstärkt von den Zellen des inflammatorischen Infiltrats und dem Atemwegsepithel gebildet, und stehen im Verdacht, regulierende Eigenschaften in Bezug auf das Entzündungsgeschehen zu besitzen. Dabei zeigte sich in verschiedenen Studien, dass diese Proteine über ihre spezifischen Rezeptoren, die Trk-Rezeptoren, Überlebenssignale für Entzündungszellen darstellen und an den chronischen Umbauprozessen der Atemwege beteiligt sind. Einen eventuellen Einfluss der Neurotrophine auf Patientenstudien dargelegt werden. Die Regulation der Zellhomöostase sowie kontinuierlicher Antikörperproduktion lokaler pulmonaler Plasmazellen durch gewebsspezifische Faktoren wie z.B. die Neurotrophine innerhalb der allergischen Atemwegsentzündung ist bisher aber völlig unklar. Ziele dieser Arbeit waren daher, folgende Fragestellungen zu beleuchten:

1. Ist die Anwesenheit bzw. das Überleben pulmonaler Plasmazellen lokal in der allergischen Atemwegsentzündung abhängig vom lokalen Entzündungsgeschehen?
2. Findet eine spezifische Anpassung an das vorhandene Mikromilieu über die Ausprägung spezieller Oberflächenrezeptoren statt?
3. Inwiefern spielen die lokal gebildeten Neurotrophine, insbesondere das NGF, eine Rolle im Überleben und der Antikörperproduktion der lokalen pulmonalen Plasmazellen?
4. Welche intrazellulären Faktoren der Plasmazelle sind an der Zellhomöostase beteiligt?

Diese Fragen sollte mit Hilfe des Mausmodells des allergischen Asthma bronchiale und unter Einbeziehung von durchflusszytometrischen Analysetechniken sowie der Anwendung von molekularbiologischen Methoden beantwortet werden.

2. Material & Methoden

2.1. Übersicht über die verwendeten Materialien

Tab. 1 Antikörper und Farbstoffe

Annexin V-Fitc Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Ratte Anti-Maus CD138-PE (281-2)	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Ratte Anti-Maus B220-PERCP (RA3-6132)	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Ratte Anti-Maus I-A/I-E (2G9)-Fitc	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Ratte Anti-Maus CD16/CD32 (24G2), Fcγ-Block	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Ratte Anti-Maus CD40 (HM40-3)	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Ratte Anti-Maus Ig λ_1 λ_2 & λ_3 -Fitc (R26-46)	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Ratte Anti-Maus kappa-Fitc	Southern Biotech, Birmingham, USA
Ratte Anti-Maus CD3e-PerCP (145-2C11)	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Ratte Anti-Maus CD8a-Fitc (53-6.7)	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Ratte Anti-Maus CD4-PE (RM45)	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Hamster Anti-Maus CD183 (CXCR3)-173-APC	BioLegend, Uithoorn, NL
OVA-Cy5	DRFZ, Berlin, D
Kaninchen Anti-Maus TrkA (sc-118)	Santa Cruz, Heidelberg, D
Kaninchen Anti-Maus TrkC (sc-117)	Santa Cruz, Heidelberg, D
Kaninchen Anti-Maus NGF-2.5S	Sigma, Taufkirchen, D
Gans Anti-Kaninchen IgG Pox (A8275)	Sigma, Taufkirchen, D
7-AAD	BD Pharmingen, Heidelberg, D

Tab. 2 Kits

Apo-One Homogenous Caspase-3/7 Assay	Promega, Mannheim, D
BCA TM Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
B Cell Isolation Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach, D
Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemilumineszent)	Roche, Mannheim, D

CellTiter-Blue Assay	Promega, Mannheim, D
In situ Cell Death Detection Kit, POD	Roche, Mannheim, D
Plasma Cell Isolation Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach, D
RNAeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, D

Tab.: 3 Versuchstiere

Balb/c Maus	Harlan Winkelmann, Borchon, D
C57BL/6 Maus	Harlan Winkelmann, Borchon, D
NGF transgene Mäuse	AG Renz, BMFZ, Marburg, D

Tab.: 4 Chemikalien

Accu Prime Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, D
Adenosintriphosphat (ATP)	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, D
Agarose GTQ	Roth, Karlsruhe, D
Albumin bovine Fraction V (BSA)	Serva, Heidelberg, D
BCA TM Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
BM Blue POD Substrat	Roche, Mannheim, D
BSA	Roth, Karlsruhe, D
CASY [®] Ton	Schärfe Systems, Reutlingen, D
CellFix	BD, Heidelberg, D
Complete Protease-Inhibitor Tablette	Roche, Mannheim, D
DAB	Vector, Burlingame, USA
Desoxyribonuclease I, Amplifikation Grade	Invitrogen, Karlsruhe, D
Diff-Quick [®] -Lösung	Dade-Behring, Marburg, D
Dithiothreitol (DTT)	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Na ₂ EDTA)	Roth, Karlsruhe, D
Eosin G	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe, D
FCS Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Gel-Loading-Solution I	Sigma, Taufkirchen, D
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, D

Hämatoxilin II nach Gill	Merck, Darmstadt, D
HiPerFect Transfektionsmedium	Qiagen, Hilden, D
HotStarTaq Master Mix	Qiagen, Hilden, D
Hydroxyurea	Sigma, Taufkirchen, D
Inject [®] Alum (Al(OH) ₃)	Pierce, Rockfort, USA
Interleukin-4, rekombinant	Biosource, Karlsruhe, D
Ketamin Inresa	Inresa, Freiburg, D
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Natrium-Chlorid (NaCl)	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid Plättchen (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
NGF rekombinant, human (rhNGF)	ImmunoTools, Friesoythe, D
NT3 rekombinant, human (rhNT3)	ImmunoTools, Friesoythe, D
OVA Grade V	Sigma, Taufkirchen, D
OVA Grade VI	Sigma, Taufkirchen, D
PanColl Mouse	PAN Biotech, Aidenbach, D
Pansorbin	Calbiochem, Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
PAS-Färbekit	Merck, Darmstadt, D
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , (Pulver)	Biochrom Ag, Berlin, D
PBS Dulbeccos (1x) ohne Ca. u. Mg.	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
QuantitTect [™] SYBR [®] Green PCR Master Mix	Qiagen, Hilden, D
Rnase Out	Invitrogen, Karlsruhe
RNAse freies Wasser	Eppendorf, Hamburg, D
Rompun 2% (Xylazin)	Bayer Health Care, Leverkusen, D
ROTI [®] Agarose Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe, D
Roticlear (Xylolersatz)	Roth, Karlsruhe, D
RPMI 1640 (1x) ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Schwefelsäure 95-97% (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Sodiumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D

Streptavidin-Peroxidase	Sigma, Taufkirchen, D
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Staufen, D
TrkA-Inhibitor	Calbiochem, Karlsruhe, D
Tricin	Sigma, Taufkirchen, D
Tris-HCl-Lösung 1M	Invitrogen, Karlsruhe, D
TRIZMA Base	Sigma, Taufkirchen, D
Tween®20	Roth, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D

Tab.: 5 ELISA-Reagenzien

ELISA Primäre Antikörper:	
Anti-Maus IgE	Binding Site, Schwetzingen, D
Anti-Maus IgG1 (A85-3)	BD Pharmingen, San Diego, USA
ELISA Sekundäre Antikörper:	
Anti-mouse IgE biotyniliert	BD Pharmingen, San Diego, USA
Anti-mouse IgG1 biotinyliert	BD Pharmingen, San Diego, USA
Anti-mouse IgG2a biotinyliert	BD Pharmingen, San Diego, USA
ELISA Standards:	
Anti-OVA chicken	AntibodyShop, Gentofte, D
Maus-Anti-OVA IgG1	Sigma, Taufkirchen, D
Maus-Anti-OVA IgE	Serotec, Düsseldorf, D
Maus IgE	BD Pharmingen, San Diego, USA
Maus IgG1 (S ₁ -68.1)	BD Pharmingen, San Diego, USA
ELISA-Kits	
NGF E _{max} Immuno Assay System	Promega, Mannheim, D

Tab.: 6 Verbrauchmaterialien

0,1 ml Strip-Tubes	Corbett, Sydney, AUS
348-Well-Mikrotiterplatte Maxisorp	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well-Platten (steril, Flachboden)	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well-Platten schwarz, Opaque Plate	Costar, Cambridge, USA
Braunüle	Sarstedt, München, D

Casy [®] Cups	Schärfe Systems, Reutlingen, D
Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde, D
FACS-Röhrchen BD Falcon [™]	BD, Heidelberg, D
Objekträger, Matrand	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Parafilm	Pechiney, Chicago, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße (15 ml)	Sarstedt, München, D
Reaktionsgefäße (50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Tissue Tek Cryomold Standard	Sakura Finetek, Staufen, D
Zellsiebe 100 µm	BD Falcon, Bedford, USA

Tab.: 7 Primer (murin)

Hergestellt von Metabion, Martinsried, D

	Primer sense (5'-3')	Primer antisense (5'-3')
L32	AACCCAGAGGCATTGACAAC	ATTGTGGACCAGGAAGTTGC
GAPDH	AACTTTGGCATTGTACG	GGATGCAGGGATGATGTTCT
TrkA	ATTGTTCTGTGCCCTGTTC	CCACAAGTGGTGTGTGTCC
TrkB	TGCTTGCCGTAGGTGAAGAT	AACCTGCTGGTGAAAATTGG
TrkC	GAAGGAGACAATGCCGTGAT	TGGCATGTACATTGGTCCAG
NGF	TACGGTTCTGCCTGTACG	CCAAGCTCACCTCAGTGTC
BDNF	AGGACGCGGACTTGTACACT	TCAGTTGGCCTTTGGATACC
NT3	CTGAGTGACAGCACCCCTTT	CAGCACTGTGACCTGGTGTC
PRDM1 (Blimp1)	GGATCTGACCCGAATCAATG	CATGGAGGTCACATCGACAC
XBP1	TATCCTTTTGGGCATTCTGG	AAAGGGAGGCTGGTAAGGAA
Bcl2	GGAAGTGAAGTGCCATTGGT	TAGCCCCTCTGTGACAGCTT
Hspa5	TGCAGCAGGACATCAAGTTC	TTTCTTCTGGGGCAAATGTC
Edem1	AAGCCTGCAATGAAGGAGAA	CTGCAGTCCAGGGAAGAAAG
CD3e	ATCACTCTGGGCTTGCTGAT	TAGTCTGGGTTGGGAACAGG
IL-6	TGCCTTCTTGGGACTGATGC	GCCTCCGACTTGTGAAGTGG
RelA/p65	GACCTGGAGCAAGCCATTAG	ATCGTATGTGAGAGGACAGG

Tab.: 8 **siRNAs**

Mm_Ntrk1_3HP siRNA	Qiagen, Hilden, D
Neg. Control siRNA	Qiagen, Hilden, D
Neg. Control siRNA-Alexa Fluor 488	Qiagen, Hilden, D

Tab.: 9 **Geräte**

Accu-Cut [®] SRM [™] 200 Rotary microtome	Sakura Finetek, Torrance, USA
Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
Brutschrank	Heraeus, Osterode, D
CASY [®] Model TT (Cell-Counter)	Schärfe Systems, Reutlingen, D
Elektrophorese System	Peqlab, Erlangen, D
FACS Sort	BD, Heidelberg, D
Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen, D
Gel Doc 2000	Bio Rad, München, D
Glasexpositions-kammer	Forschungswerkstätten, Medizinische Hochschule Hannover, D
Immuno [™] wash 12 Mikrotiterplatten-washer	Nunc, Wiesbaden, D
Kühlzentrifuge BIOFUGE fresco	Kendro, Langenselbold, D
Lumi Star	BMG, Offenburg, D
Mikroskop Olympus BX51	Olympus, Hamburg, D
Mikrotiterplattenreader Sunrise	Tecan, Crailsheim, D
Pari [®] Master	Pari, Starnberg, D
Plattenschüttler DSG 304/M4	Heidolph, Schwabach, D
RotorGene [™] 3000e	Corbett, Sydney, AUS
Schüttelinkubator GFL 3031	GFL, Burgwedel, D
Spannungsgenerator EPS 3500	Pharmacia, Uppsala, S
Thermocell Cooling & Heating Block	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Ultraspec 3100pro UV/Visibel Spectrophotometer	Biochrom, Cambridge, UK
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode, D
Zytozentrifuge Cytospin 3	Shandon, Frankfurt, D

Tab.: 10 Software

Auswertungssoftware Magellan	Tecan, Crailsheim, D
CellF Imaging	Olympus, Hamburg, D
CellQuestPro	BD, Heidelberg, D
GelScan Pro V5.0	BioSciTec GmbH, Frankfurt, D
GraphPad Prism [®]	GraphPad Software, La Jolla (CA),
Lumi Star Software	BMG, Offenburg, D
RotorGene [™] Software	Corbett, Sydney, AUS

2.2. Tiere und Behandlungsprotokolle

2.2.1. Mäusstämme

In dieser Arbeit wurden ausschließlich weibliche Tiere der Spezies Maus (*Mus musculus*) eingesetzt. Es wurden die Stämme Balb/c und C57BL/6 verwendet. Darüber hinaus wurden NGF transgene Tiere verwendet, die in der Tierhaltung des BMFZ selbst gezüchtet wurden. Diese Tiere zeichnen sich durch eine kontinuierliche Expression und Sekretion von NGF in den Atemwegsepithelien aus. Der genetische Hintergrund der Tiere ist der C57BL/6 Stamm. Die anderen Versuchstiere wurden von Harlan Winkelmann (Borche, Deutschland) erworben. Alle Tiere wurden unter speziellen Pathogen-freien Bedingungen im Tierstall des BMFZ gehalten. Sie erhielten Ovalbumin-freies Wasser und Futter *ad libitum*. Alle Tiere wurden mit Zustimmung und in Übereinstimmung mit internationalen Richtlinien durchgeführt.

2.2.2. Induktion der allergischen Atemwegsentzündung mittels Ovalbumin Sensibilisierung und mukosaler Provokation

Für die Ausbildung der allergischen Atemwegsentzündung bzw. des allergischen Asthmas in der Maus war zuerst eine Immunisierung gegen das Allergen notwendig. Diese so genannte Sensibilisierung erfolgte über die intraperitoneale (i.p.) Verabreichung von 10 µg des artfremden Proteins Ovalbumin zusammen mit 100µg des Adjuvanz Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃), gelöst in 100 µl PBS. Die Immunisierung erfolgte dreimal an den Tagen 1, 14 und 21. Durch die Sensibilisierung wird eine erste T_H2-Immunantwort im Körper der Maus induziert. In deren ca. dreiwöchigen Verlauf kommt es u.a. zur Ausbildung von Allergen-

spezifischen B-Gedächtniszellen, die wiederum in einer nachfolgenden Allergenprovokation zu kompetenten Allergen-spezifischen Plasmazellen differenzieren können. Die anschließende Allergenprovokation erfolgt nach drei Wochen durch die 20 minütige Inhalation von 1% OVA-Aerosol in luftdichten Expositions-kammern. Dies wurde jeden dritten Tag wiederholt und insgesamt fünfmal durchgeführt (Abb.2), und führte schließlich zur Ausbildung einer allergischen Atemwegsentzündung sowie der charakteristischen Atemwegshyperreagibilität. Die Analyse der Tiere erfolgte jeweils 24 h nach letztmaliger OVA-Aerosol Behandlung.

Für eine Langzeitbehandlung werden die Tiere über 12 Wochen an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit OVA-Aerosol behandelt. Die Sensibilisierungsreaktion erfolgt wie oben beschrieben.

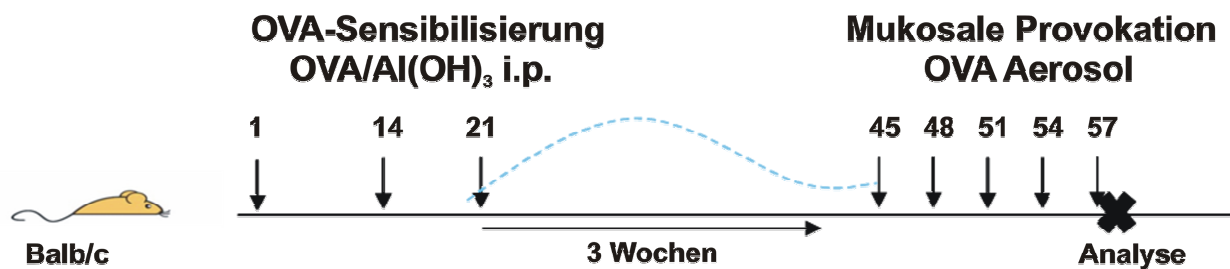


Abb. 2: Behandlungsprotokoll für die Induktion des allergischen Asthma in der Maus. Balb/c Mäuse werden zu Beginn mit OVA/Al(OH)₃ gegen das Allergen OVA sensibilisiert und anschließend mit OVA-Aerosol behandelt.

2.2.3. Lokale Inhibition des TrkA-Rezeptor

Für die lokale Inhibition des TrkA-Rezeptors wurden 6-8 Wochen alte Balb/c Tiere wie in 2.2.2. beschrieben sensibilisiert und anschließend nach drei Wochen zweimal an aufeinander folgenden Tagen mit 1% OVA-Aerosol behandelt. Drei Tage nach der letzten Inhalation wurden den Tieren 6 nmol des TrkA-Inhibitors (Calbiochem) gelöst in 40 µl PBS intranasal (i.n.) verabreicht. Dies wurde 24 h später wiederholt (siehe Abb. 3). Den Kontrolltieren wurden anstatt des TrkA-Inhibitors 40µl PBS i.n. verabreicht. Die Analyse der Tiere erfolgte 24 h nach der letzten Inhibitor-Verabreichung (siehe Abb. 3). Für die intranasale Behandlung wurden die Tiere jeweils mit 200 µl einer Narkoselösung bestehend aus Ketamin/Rompun (50mg/ml) durch intraperitoneale Gabe kurzzeitig betäubt. Alle verabreichten Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und verabreicht um eine Kontamination der Tiere mit Bakterien zu vermeiden. Die Gruppenstärke betrug 5 Tiere pro Gruppe. Der Versuch wurde unabhängig voneinander zweimal wiederholt.

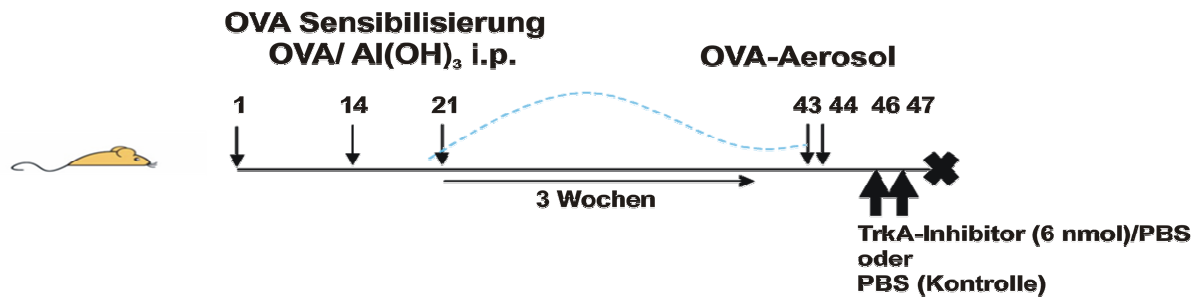


Abb. 3: Behandlungsprotokoll für die lokale Inhibition des TrkA-Rezeptors durch zweimalige intranasale Applikation des spezifischen TrkA-Inhibitors (6 nmol). Kontrolltiere erhielten PBS/DMSO. Die Tiere wurden 24 h nach Ende der Behandlung analysiert.

2.2.4. Gewinnung von Serumproben

Die Tiere wurden nach der Gabe von 200 µl 5x Narkoselösung (siehe 2.2.3.) in tiefer Narkose durch einen Achselschnitt entblutet. Das Blut wurde für eine vollständige Blutgerinnung bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Serumüberstände vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.5. Broncho-alveoläre Lavage (BAL)

Die Broncho-alveoläre Lavage (BAL) ist eine Methode zur Gewinnung von Probenmaterial aus den peripheren und distalen Atemwegen durch die „Spülung“ der Lunge mit Pufferlösung. Dazu wurde der getöteten und entbluteten Maus der Brustkorb und der Halsbereich frei präpariert, und mittels einer 20G Kanüle über die Trachea PBS, versetzt mit Proteaseinhibitor (Roche, D), in die Lunge appliziert. Die Entnahme des applizierten PBS erfolgte über eine aufgesetzte Spritze. Die gewonnene BAL wurde daraufhin bei 350 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Lagerung des Überstandes erfolgte bei -20°C. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS/1%BSA Lösung resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe 2.3.1). Anschließend erfolgte die Verdünnung von 50 µl der resuspendierten BAL-Zellen in PBS/1%BSA Lösung und die Zentrifugation mit einer Zytocentrifuge (Shandon, D) bei 700 rpm für 5 min. Dies führte zur Verteilung der Zellen auf einen Objektträger, während die Flüssigkeit von einem Filterpapier aufgesogen wurde. Die Präparate wurden 1 h bei RT getrocknet und anschließend mittels Diff-Quick-Lösung (Dade-Behring, D) gefärbt. Die Zelldifferenzierung erfolgte lichtmikroskopisch bei 400facher Vergrößerung anhand morphologischer Charakteristika.

2.3. Zellpräparation

Für die Zellpräparation wurden die Mäuse wie in 2.2.4. entblutet. Anschließend wurden die drainierenden Lymphknoten der Lunge (Hilus-Lymphknoten), die Milz und die Knochen (Femur und Tibia) entnommen. Die Lunge wurde mit einer 1%igen PBS Lösung perfundiert um eine Kontamination des Lungengewebes mit Zellen des Blutes zu vermeiden. Dabei wurde die rechte Herzkammer des Tieres mit einer Kanüle punktiert, um anschließend mit Hilfe einer Spritze die PBS-Lösung über die pulmonare Arterie in die Lunge zu drücken. Dies führte zur Verteilung der PBS-Lösung über die Blutgefäße, in der gesamten Lunge und deren Spülung. Die so gespülte Lunge wurde anschließend entfernt und zerkleinert.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden Milz, Lunge und die Lymphknoten durch ein Zellsieb mit einer Maschengröße von 100 μm (BD Falcon, D) gedrückt, und in 50 ml kaltem PBS aufgenommen.

Die Gewinnung des Knochenmarkes erfolgte über die Entfernung der Enden der Röhrenknochen und deren Spülung mit PBS, durch die Hilfe einer Spritze mit 25 Gauge Kanüle. Das gewonnene Knochenmark wurde ebenfalls anschließend durch ein Zellsieb gedrückt.

Die Lungenzellsuspension wurde nach Gewinnung auf einen isotonischen Pancoll-Dichtgradient (Cytogen, D) geladen, und bei 1200 x g für 20 min. ohne Bremse zentrifugiert. Dies führte zur Trennung der mononukleären Zellen (*Mononuclear cells*, *MNCs*), welche die Lymphozytenpopulation enthalten, von den Granulozyten und den Strukturzellen der Lunge. Die *MNCs* bildeten eine Interphase im Gradienten, und wurden nach Beendigung der Zentrifugation mit einer Transferpipette vorsichtig entfernt. Nach anschließendem Waschen der Zellen für 10 min bei 300 x g und 4°C, und der Resuspension des Pellets in 1 ml PBS, erfolgte die Entfernung der Erythrozyten aus der Suspension. Dazu wurden die Zellen erneut zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1ml A.dest. aufgenommen. Nach ca. 10 Sekunden wurden die Zellen auf 10 ml PBS aufgefüllt und erneut für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml PBS aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen auf Eis bzw. bei 4°C.

2.3.1. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl in der Einzelzellsuspension erfolgte mit dem CASY DT System. Es basiert auf der elektronischen Pulsanalyse und erlaubt die Messung von Zellzahl

zusammen mit einer lebend/tot-Unterscheidung anhand der Zellgröße. Die Messgenauigkeit beträgt dabei 0,1 μm . Zur Messung der Zellzahlen wurde ein Größenbereich von 5,5 bis 30 μm angegeben. Die Zellzahl wird in Zellen pro ml angegeben. Nach erfolgter Messung wurde die jeweils erwünschte Zellzahl eingestellt.

2.4. Durchflusszytometrische Analyse

2.4.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur simultanen Charakterisierung verschiedener Einzelzellen hinsichtlich ihrer physischen Eigenschaften. Dabei können diese anhand ihrer Größe, Granularität und der Ausprägung membranständiger sowie intrazellulärer Moleküle bestimmt werden. Dabei werden die Leukozyten oftmals anhand der Ausprägung von so genannten Differenzierungsantigenen (*cluster of differentiation-CD*) charakterisiert. Dies erfolgt über die Färbung von Oberflächenmolekülen, sowie intrazellulären Molekülen mit Hilfe Fluorochrom-markierter Antikörper. Während die Einzellzellen hintereinander durch die Messkammer fließen werden sie durch Laserlicht angeregt, und können je nach Größe, Granularität und etwaiger gebundener Fluorochrom-markierter Antikörper Licht emittieren, welches durch spezielle Filter absorbiert wird. Aufgrund der unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheit und Größe der Zellen wird das Licht unterschiedlich gestreut. Dabei können Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten bereits über das in einem Winkel von 3-10°C abgelenkte Vorwärtstreulicht (*forward scatter, FSC*) und das um 90°C reflektierte Seitwärtstreulicht (*side scatter, SSC*) identifiziert werden. Eine weitere Einteilung erfolgt durch die unterschiedliche Lichtemission Fluoreszenz-markierter Zellen in einem zweidimensionalen Punktdiagramm (*dot blot*). Diese Technik ermöglicht Aussagen über die Frequenz einzelner Zellpopulationen innerhalb einer Zellsuspension zu treffen.

Für diese Arbeit wurde ein Gerät des Typs FACS Calibur von Becton Dickinson verwendet. Für die Analyse der in dieser Arbeit gezeigten Daten wurde die CellQuestTM Research Software (BD, D) verwendet.

2.4.2. Oberflächenfärbung

Die Oberflächenfärbung von Zellen für die Durchflusszytometrie wurde mit kaltem FACS-Puffer (1% PBS/1% FCS) und bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden zuerst in 100 μl

FACS-Puffer aufgenommen und mit einem Anti-Fc γ R Antikörper (BD, D) ($1\mu\text{g}/10^6$ Zellen) für 5 min bei 4°C präinkubiert. Dieser Schritt diente der Vermeidung von falsch positiven Signalen, da Färbeantikörper unspezifisch an niedrig affine Fc γ -Rezeptoren binden können. Dieser so genannte Fc-Block verhindert die Bindung der Färbeantikörper an die Rezeptoren *Fc γ RIII* (*CD16*) sowie den *Fc γ RII* (*CD23*). Anschließend wurden die Zellen mit durchschnittlich 1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ der Färbeantikörper für 30 min auf Eis inkubiert und danach mit 2 ml FACS-Puffer für 10 min bei 300 x g und 4°C gewaschen. Der Überstand wurde entfernt, und das Zellpellet für die sofortige Analyse am Durchflusszytometer in 300 μl FACS-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Für eine längerfristige Aufbewahrung der Zellen wurden diese statt in FACS-Puffer in 300 μl CellFix (BD, D) aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Zur Kontrolle der Spezifität der genutzten Antikörper wurde jeweils eine zugehörige spezifische Isotypenkontrolle mitgefärbt.

2.4.3. Intrazelluläre Färbungen

Für die intrazelluläre Färbung müssen die Zellen zuvor mit Paraformaldehyd fixiert werden, was zur Quervernetzung der Proteine führt. Dafür wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung in 100 μl Cytofix/Cytoperm Puffer (BD, D) aufgenommen und für 15 min bei RT und Dunkelheit inkubiert. Anschließendes Waschen der Zellen mit 1 ml PermWash Puffer (BD, D) für 5 min bei 300 x g, führte gleichzeitig zur Permeabilisierung der Zellen durch das enthaltene Detergenz Saponin. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit den jeweiligen Antikörpern für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Waschschritt erfolgte die Messung am Durchflusszytometer. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte wie oben beschrieben (siehe 2.4.2.).

2.4.4. Bestimmung der Zellvitalität mittels Durchflusszytometrie

Für die Bestimmung der Zellvitalität werden so genannte interkalierende Avitalfarbstoffe mit spezifischen Fluoreszenzeigenschaften wie z.B. Propidium Iodid (*PI*) und 7-Amino Actinomycin (*7-AAD*) verwendet. Diese Farbstoffe sind allerdings nur in der Lage, sich in die DNA von bereits toten oder sich im Endstadium der Apoptose befindlichen Zellen einzulagern. Zellen mit einer intakten Zellmembran dagegen sind nicht in der Lage diese Farbstoffe aufzunehmen. Die Fluoreszenzemission der Farbstoffe kann in der Durchflusszytometrie gemessen werden und dient somit der Unterscheidung zwischen

lebenden und toten Zellen. Des Weiteren nutzt man das *Phospholipid-binding protein* (*V-Annexin*) zur Identifizierung von apoptotischen Zellen. Es bindet hochaffin Phospholipid-Phosphatidylserine, die während des Verlusts der Membranstabilität innerhalb der frühen Apoptose von der inneren an die äußere Seite der Membran transloziert werden. Das mit einem Fluorochrom konjugierte V-Annexin kann dadurch ebenfalls in der Durchflusszytometrie verwendet werden.

Zur Bestimmung der Zellvitalität von isolierten und kultivierten Plasmazellen wurden diese 5 min mit 2 µl 7-AAD (BD, D) inkubiert und anschließend bei 650 nm im FACS gemessen. Zur weiteren Bestimmung von apoptotischen Zellen wurde das *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I* von BD genutzt. Dieses beinhaltet den Farbstoff PI und das mit dem FITC-konjugierte V-Annexin. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde der prozentuale Anteil der vitalen Zellen mit dem Anteil der toten Zellen pro Probe bestimmt und untereinander verglichen. Jedes Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

2.5. Isolierung und Kultivierung von Plasmazellen

2.5.1 Zellisolierung

Für die Isolierung von Zellen, in vorliegender Arbeit Plasmazellen, können grundsätzlich zwei Methoden angewandt werden: die magnetisch-assoziierte Zellsortierung (*MACS*) und die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (*FACS*). In beiden Methoden werden die Zellen anhand der Ausprägung spezifischer Oberflächenmoleküle getrennt. Beide Methoden können auch kombiniert werden.

2.5.1.1. Magnetische Zellisolierung

Die Magnetische Zellisolierung basiert auf der Anwendung von Antikörpern, welche mit ca. 50 nm großen magnetischen Kügelchen (*magnetic Beads*) konjugiert sind. Diese Antikörper sind, vergleichbar mit den Antikörpern für die Durchflusszytometrie, gegen spezifische Oberflächenantigene gerichtet. Nach der Inkubation der Zellen mit diesen Antikörpern wird die Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, welche eine Matrix aus Stahlwolle besitzt, und sich in einem Magnetfeld befindet. Die magnetisch markierten Zellen werden im Magnetfeld der Säule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen diese ungehindert passieren können. Die markierten Zellen können anschließend außerhalb des Magnetfeldes

aus der Säule gewaschen werden. Diese Methode ermöglicht sowohl eine positive Selektion als auch eine Depletion von spezifischen Zellen. Alle magnetischen Zellisolationen in dieser Arbeit erfolgten mit Hilfe des MACS-Systems (Miltenyi, D).

2.5.1.2. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Die FACS-Sortierung basiert auf der Trennung von Zellpopulationen anhand der Färbung mit Fluorochromen. Das Prinzip entspricht dabei dem der Durchflusszytometrie. Die Zellen werden gemessen, und anhand ihrer Fluoreszenzmarkierung in spezifische Populationen aufgeteilt. Es wird anschließend die Population im Punktdiagramm durch ein Analysefenster (*gate*) festgelegt, welche aus der Zellsuspension herausgetrennt werden soll. Dazu wird der Flüssigkeitsstrahl, in welchem sich die Zellen befinden, nach Passierung des Laserstrahls so abgelenkt, dass sich einzelne Tröpfchen mit jeweils einer einzelnen Zelle bilden. Diese werden dann anschließend durch einen Impuls abgelenkt und separat aufgefangen. In dieser Arbeit erfolgte die Zellsortierung am FACS Calibur unter Verwendung der CellQuest Software statt.

2.5.2. Isolierung der Plasmazellen

Für die Isolierung von Plasmazellen aus allergischen Mäusen (siehe 2.2.2.) mussten diese zunächst aus Einzelzellsuspensionen der einzelnen Gewebe isoliert werden. Die Herstellung der Einzelzellsuspension wurde wie in 2.3. beschrieben durchgeführt. Nach Herstellung der Einzelzellsuspension wurden die Zellen (mindestens 10^6) zunächst wie in 2.4.2 beschrieben mit einem Fc-Block behandelt und anschließend mit spezifischen, magnetisch markierten Antikörpern inkubiert. Da die Plasmazellen nur in geringer Anzahl in den Organen vorhanden sind, wurden für die folgenden Experimente die Einzelzellsuspensionen verschiedener Tiere gepoolt und anschließend aufgereinigt. Für die magnetische Anreicherung von $CD138^+$ Zellen wurde das Maus-spezifische *Plasma Cell-Isolation Kit* und den dazugehörigen LD^+ und MS^+ Säulen der Firma Miltenyi unter Beachtung der Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden zunächst B-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) mittels spezifischer Antikörper gegen B220 (CD45R) und DX5 (CD49b) aus der Zellsuspension depletiert und verworfen. Anschließend erfolgte die Isolierung von Zellen, die eine starke Expression von CD138, aber mangelnde bzw. schwache Expression von B220 und CD19 aufwiesen unter der Verwendung von anti-CD138 Antikörpern (positive Isolierung). Die Ausprägung des B-Zellrezeptors

CD45R (B220 in der Maus) sowie CD19 sind Charakteristika von B-Zellen. Sie werden aber nicht mehr oder nur sehr schwach von reifen Plasmazellen ausgeprägt. Die angereicherte CD138⁺ Fraktion wurde nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer entsprechend dem Protokoll der FACS-Oberflächenfärbung (siehe 2.4.2) weiter behandelt. Dabei wurden Fluorochrom-konjugierte Antikörper gegen B220 und CD138 verwendet. Anschließend wurden bei der Sortierung die B220^{neg.}/CD138⁺ Fraktion in ein separates Röhrchen sortiert.

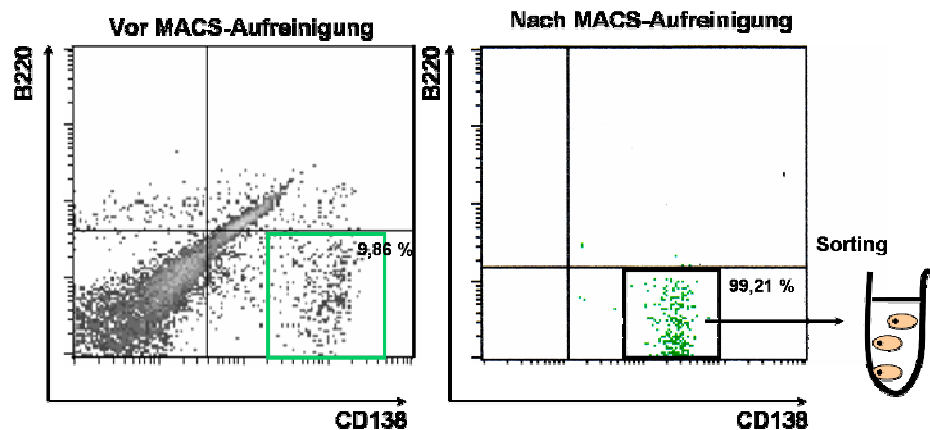


Abb.5.: Isolation von Plasmazellen am Beispiel der Lunge. CD138^{pos}/B220^{neg} Plasmazellen (Lymphozytengate) aus Einzelzellsuspensionen von Lunge, Milz und Knochenmark wurden durch magnetisch-assoziierte Zellsortierung angereichert und anschließend am Sortierer isoliert.

Die Isolierung und anschließende RNA-Präparation isotypspezifischer bzw. Allergen-spezifischer Plasmazellen ist aufgrund der Fixierung mit Paraformaldehyd nicht möglich, weswegen nur Oberflächenfärbungen für die Isolierung eingesetzt werden können. Die Zellen wurden anschließend in RLT-Puffer + 1% β -Mercaptoethanol (β -ME) (Qiagen, D) aufgenommen und bis zu weiteren Analyse (siehe 2.6.1 & 2.6.3.) bei 4°C aufbewahrt. Eine weitere Oberflächenfärbung der zuvor mittels magnetisch-assoziiierter Zellsortierung isolierten Plasmazellen mit einem spezifischer Anti-MHC II Antikörper zeigte nur eine sehr schwache oder fehlende Präsenz von MHC II auf der Oberfläche der Zellen (siehe Abb. 6.). Somit wurden diese Zellen als reife Plasmazellen (CD138^{pos}/B220^{neg.}/CD19^{neg.}/MHC II^{neg}) definiert.

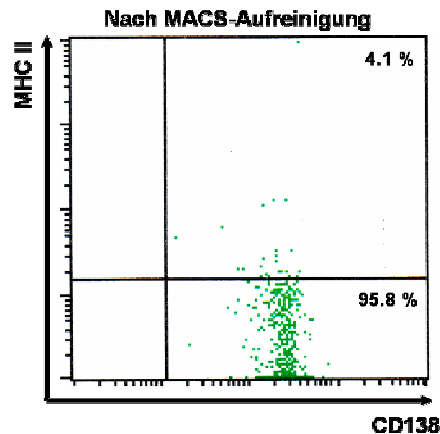


Abb.6.: MHC II-spezifische Färbung isolierter Plasmazellen aus Einzelzellsuspension der Lunge. Gezeigt sind mittels magnetisch-assoziiierter Zellsortierung isolierte $CD138^{pos}/B220^{neg}$ und $MHC\ II^{neg}$ Plasmazellen der Lunge.

2.5.3. Kultivierung von Plasmazellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen

Für die Kultivierung von Plasmazellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen wurden diese u.a. aus den Atemwegen allergischer Mäuse (siehe 2.2.2.) isoliert und anschließend drei Tage bei 37°C und 5% CO₂ in Kultur genommen. Die während der magnetischen Isolation eingesetzten Antikörper sind nicht Fluorochrom gekoppelt und können daher bei der späteren Messung am FACS-Gerät keine störenden Fluoreszenzen verursachen. Des Weiteren besitzen die für die FACS-Färbung verwendeten Antikörper Natriumazid als Konservierungsmittel, das als toxische Substanz die Überlebensfähigkeit von kultivierten Zellen beeinflussen könnte. Aufgrund dessen wurden für die Kulturexperimente auf das Sortieren mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern verzichtet und die Zellen mittels des *Plasma Cell Isolation Kit* (Miltenyi, D) isoliert. Dafür wurde wie in 2.3. beschrieben eine Einzelzellsuspension der Gewebe hergestellt und anschließend mit einem Fcγ-Block behandelt (2.5.2.). Mittels des Kits wurden $CD138^{+}$, $B220^{neg.}$, $CD19^{neg.}$ Plasmazellen aufgereinigt, deren Reinheit mittels FACS-Färbung und Messung auf >95% bestimmt werden konnte. Anschließend erfolgte eine spez. Färbung gegen MHC II (siehe Abb.6.).

Nach erfolgter Isolation wurden die Zellen gezählt (siehe 2.3.1.), in RPMI-Vollmedium aufgenommen und gleichmäßig auf die Vertiefungen einer 96 Well Platte verteilt, so dass mindestens 5×10^3 Zellen pro Well vorlagen. Pro Versuchsansatz wurden je 10 Wells eingesetzt. Dabei wurden pro Well 500 µl RPMI-Vollmedium zugesetzt, welches mit den entsprechenden Konzentrationen von rekombinanten NGF (ImmunoTools, D) (je 0,5; 1, 5 und 25 ng/ml) und rekombinanten NT3 (ImmunoTools, D) (je 0,5; 1, 5 und 25 ng/ml) versetzt

worden war. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die in Medium ohne Zusätze kultiviert worden waren.

Die Quantifizierung überlebender Plasmazellen nach 72 h erfolgte über die Färbung mittels 7-AAD und der Bestimmung des Verhältnisses lebender zu toten Zellen. Ebenso wurde bei beiden Experimenten mittels BrdU-ELISA (siehe 2.7.3) die Proliferationstätigkeit der Plasmazellen getestet. Damit sollte gewährleistet werden, dass die beobachteten Effekte nach der Stimulation Überlebens-effekte teilungsinaktiver, reifer Plasmazellen sind, und nicht durch die Proliferation einzelner kontaminierender Plasmablasten zu Stande kamen. Als Kontrolle wurden zusätzlich Plasmazellen mit dem Proliferationsinhibitor Hydroxyura (0,5 mM) kultiviert.

Zusätzlich wurden Plasmazellen (mindestens 10^5) zusammen mit 10 ng/ml NGF für 16 h in Kultur genommen. Diese Zellen wurden nach 16 h geerntet und in RTL-Puffer + 1% β -ME aufgenommen. Anschließend wurde wie in 2.6.1 beschrieben die RNA isoliert und mittels quantitativer PCR (siehe 2.6.3.) analysiert.

In einem weiteren Ansatz wurden wie oben beschrieben, Plasmazellen isoliert und mit je 25 ng/ml NGF für drei Tage inkubiert. Einem Ansatz wurde zusätzlich 6 nmol des in PBS gelösten TrkA-Inhibitor (Calbiochem, D) zugesetzt. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, welche ausschließlich in Medium inkubiert wurden sind. Zum Ausschluss von unspezifischen Effekten des TrkA-Inhibitors wurden zusätzlich Zellen in Medium zusammen mit 6 nmol des Inhibitors inkubiert. Ein weiterer Ansatz erfolgte mit Zugabe von NGF (25ng/ml) und der Applikation von 100 ng/ml eines polyklonalen anti-NGF Antikörpers (Sigma, D). Dieser neutralisiert das NGF in der Zellkultur und verhindert dadurch die Aktivierung des TrkA-Rezeptors. Nach 72 h Kultur wurde der Anteil lebender Plasmazellen mittels 7-AAD Färbung bestimmt. Zusätzlich wurden die Zellen mittels V-Annexin/PI-spezifischer Färbung auf die Induktion der Apoptose hin analysiert (siehe 2.4.4.).

Alle Experimente wurden dreimal voneinander unabhängig durchgeführt.

2.5.3. Generierung von Plasmazellen *in vitro*

Für die Generierung von Plasmazellen *in vitro* wurden lokale B-Zellen der entzündeten Atemwege magnetisch mit Hilfe des *B cell Isolation Kit* (Miltenyi, D) unter Beachtung der Herstellerangaben isoliert. Dabei wurde wie in 2.3. beschrieben das Lungengewebe präpariert und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nach der Inkubation dem Fc-Block (siehe 2.4.2.) erfolgte die magnetische Separation. Diese erlaubte die Isolierung von unberührten B-Zellen

durch die Depletion ungewollter Zellen mittels indirekter (negativer) magnetischer Markierung. Dabei werden Erythrozyten, CD4⁺ T-Zellen, NK-Zellen aber auch Plasmazellen und aktivierte B-Zellen durch Verwendung eines spezifischer Antikörper Cocktails aus der Zellsuspension entfernt. Dabei werden Biotin-konjugierte Primär- und mit magnetischen Beads-konjugierte Anti-Biotin Sekundärantikörper verwendet. Nach der Isolation der B-Zellen wurde deren Reinheitsgrad bestimmt (> 96 %), die Zellen gezählt (siehe 2.3.1.) und in RPMI-Vollmedium aufgenommen. Anschließend wurden je 5×10^5 Zellen in die Vertiefungen einer 96 Well Platte gegeben und mit 10 ng/ml *Staphylococcus aureus* cowan strain I(SAC) (Calbiochem, D), 10 ng/ml rekombinantem IL-4 (Invitrogen, D) und 2,5 µg/ml anti-CD40 Antikörper (BD, D) stimuliert und für fünf Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Stimulation mit SAC plus anti-CD40 Antikörper aktiviert die vorhandenen B-Zellen und führt zu starker Proliferation und Differenzierung der Zellen zu Plasmazellen, die verstärkt Antikörper der Klasse IgG1 produzieren. Das IL-4 fördert dabei die Proliferationstätigkeit. Die entstandenen Zellen prägen aber noch MHC II Moleküle auf ihrer Oberfläche aus, da sie zur endgültigen Reifung die externen Signale einer Überlebensnische brauchen. Sie zeigen aber sonst alle weiteren Charakteristika von Plasmazellen. Am Tag sechs wurde das Medium gewechselt und jeweils 10 ng/ml NGF oder 5 ng/ml NT3 zugegeben. Nach 16 h wurden die Zellen geerntet und in RLT-Puffer + 1% β-ME aufgenommen. Anschließend wurde die mRNA Expression der Zellen analysiert (siehe 2.6.4.) Pro Ansatz wurden jeweils 10 Wells eingesetzt. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

2.6. Molekularbiologische Analysen

2.6.1. RNA-Isolation

Für die Isolierung der RNA aus Plasmazellen wurde das *RNeasy MicroKit* von Qiagen verwendet. Dieses System basiert auf chaotropen Säulen, die die Aufreinigung von sehr geringen RNA-Mengen aus dem Ausgangsmaterial ermöglichen. Die RNA-Isolation erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Nach der RNA Aufreinigung wurde diese mit DNase I behandelt um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Dafür wurde pro Probe (Endvolumen 20 µl) 2 µl 10x DNase-Puffer (Ambion, D), 1 µl DNase I (2 U/µl)(Ambion, D) zugegeben, und 20 min. bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase I wurden 5 µl des *DNase Inactivation Reagent* (Ambion, D) zugeben, leicht vermischt und 2 min. bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend 2 min. bei 12.290 x g und RT zentrifugiert und der Überstand

mit der enthaltenen RNA vorsichtig abgenommen. Das entnommene Volumen betrug ca. 15 µl. Nach der Inkubation mit DNase I erfolgte die Konzentrationsbestimmung am Photometer (Gen Quant), und die reverse Transkription (siehe 2.6.2.). Als Kontrolle für unvollständigen DNA-Abbau nach der DNase I Behandlung wurde die isolierte RNA mittels PCR (siehe 2.6.3.) und einem Gen-spezifischen Primers gegen das *house-keeping gene* L32 getestet.

2.6.2. Reverse Transkription (RT)

Die reverse Transkription ist die Generierung einer einzelsträngigen cDNA (*copyDNA*) von einem mRNA Template. Dabei werden RNA-abhängige DNA-Polymerasen, so genannte Reverse Transkriptasen, eingesetzt, die diese Synthese katalysieren. Die in 2.6.1. gewonnene RNA wurde zunächst mit 0,5 µl 10mM dNTPs (*Desoxyribonucleotide triphosphate*) und 0,5 µl Random Hexamer Primern (10 pmol) (Invitrogen, D) pro Ansatz bei 65°C für 5 min. inkubiert, und danach auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde pro Ansatz 1 µl der Reversen Transkriptase (200 U/µl) SuperScriptII (Invitrogen, D), 2 µl 0,1 M DTT (Invitrogen, D) und 4 µl 5x Puffers (Invitrogen, D) zusammen mit 1 µl des RNase Inhibitors RNaseOUT (Invitrogen, D) zugegeben (Endvolumen 20 µl) und kurz anzentrifugiert. Die RT wurde im Biometra Cycler mit folgendem Programm durchgeführt:

25°C	10 min.
42°C	50 min.
70°C	15 min.

Proben wurden nach Beendigung der RT 1:3 mit mol H₂O verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.6.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für alle PCR-Reaktionen wurde der *Hot-Start Mix* von Qiagen verwendet. In allen Reaktionen wurde ein Mastermix mit 10 µl Hot-Start Mix, 8 µl mol H₂O und je 2 µl pro Reaktion eingesetzt. Für die PCR-Reaktionen wurde der RoboCycler 40 Gradient (Stratagene, D) genutzt.

PCR-Programm:

95 °C	15 min
95°C	20 s
Primer Annealing	40 s

72°C	X s/kb	35 Zyklen
------	--------	-----------

72°C	10 min
------	--------

Die Annealing-Temperaturen wurden Primer-spezifisch durch eine Gradienten-PCR mit dem MyCycler Gerät (Biorad, D) ermittelt. Alle verwendeten Primer wurden anschließend bei 58°C Annealing-Temperatur eingesetzt. PCR-Produkte wurden 1,5 %igen Agarosegelen aufgetrennt.

2.6.4. Quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative PCR oder auch quantitative real time PCR ermöglicht nicht nur den Nachweis, sondern auch die Quantifizierung von PCR-Produkten. Hierbei werden spezifischen Farbstoffe eingesetzt, die sich ausschließlich in doppelsträngige DNA (dsDNA) einlagern, und dadurch Fluoreszenz bestimmter Wellenlänge emittieren können. Durch den Einsatz von entsprechenden qPCR-Geräten mit integrierter Detektionseinheit kann der Gehalt doppelsträngiger DNA nach jedem Verdopplungszyklus anhand der emittierten Fluoreszenz bestimmt werden. Dabei nimmt die Fluoreszenzintensität linear mit steigender Anzahl der dsDNA-Produkte zu. Der Einsatz von Gen-spezifischen Primern ermöglicht somit die Quantitätsbestimmung eines bestimmten Gens innerhalb einer Probe. Durch die Kombination von reverser Transkription und qPCR ist es also möglich, die Menge einer spezifischen mRNA-Spezies in einer Probe zu ermitteln. Dabei werden neben den Gen-spezifischen Primern auch Primer für Referenzgene, z.B. konstant exprimierte *house keeping*-Genen, zur Normalisierung eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet. Für die qPCR wurde der Ready-to-use Mix *QuantiTectSYBR Green Mix* (Qiagen, D) verwendet. Alle eingesetzten Primer erzeugten Produkte, die zwischen 90 und 110 Basenpaare (Bp) lang waren. Es wurden pro Ansatz 5 µl des SYBR Green Mix' zusammen mit 3 µl mol H₂O und je 1 µl Primerpaar (*sense/antisense*) eingesetzt. Die eingesetzte Menge der in 2.6.2. generierten cDNA betrug 2µl. Als Referenzgene wurden L32 und GAPDH amplifiziert. Zur Normalisierung und Bestimmung der relativen mRNA Menge wurde die $\Delta\Delta C_T$ Methode (Emmanuele, Ortmann et al. 2003) unter Verwendung der L32 Referenz angewendet. Durch das Erstellen einer Schmelzkurve am Ende der PCR wurde die Spezifität der Primer überprüft.

qPCR-Programm:

95°C	15 min	
95°C	15 s	
58°C	30 s	
72°C	15 s	35 Zyklen

2.6.5. Transfektion mit TrkA-spezifischer siRNA

Für die Reduktion der TrkA-Rezeptorexpression sollten Zellen mit einer TrkA-spezifischer siRNA transfiziert werden. Dafür wurden 1×10^6 MNCs wie in 2.3. beschrieben isoliert und mit RPMI-Vollmedium (500 μ l) unter Zugabe von 10 ng IL-4, 2,5 ng/ml anti-CD40 Antikörper und 10 ng/ml SAC in einer 96 Well Platte für sieben Tage in Kultur genommen. Die Zugabe der Stimulantien ermöglicht die Aktivierung der Lymphozyten sowie die Produktion von Zytokinen. Durch die Nutzung eines NGF-spezifischen ELISA (Promega, D) konnte die Produktion von NGF in diesen Zellen nachgewiesen werden. Nach fünf Tagen wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 5 pmol/ 10^6 Zellen fast forward siRNA (Qiagen, D) transfiziert. Dafür wurde die siRNA (5 nmol) in FCS-freien RPMI-Medium 1:10 vorverdünnt. Pro Ansatz wurden 15 μ l der siRNA Verdünnung mit 35 μ l Medium gemischt und 6 μ l des HiPerFect Transfektionsreagenz (Qiagen, D) zugeben und bei RT 10 min. inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde anschließend vorsichtig auf die Zellen gegeben und diese für 3 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach drei Stunden wurden die Zellen mit Medium gewaschen um restlichen, störenden Transfektionsansatz zu entfernen und anschließend erneut inkubiert. Nach 8 und 24 h erfolgte die Ernte der Zellen und deren TrkA- bzw. Bcl2-spezifischer mRNA Expression mittels qPCR. Als Kontrollen wurden Zellen alleine mit dem Transfektionsmedium oder zusammen mit einer nicht-kodierenden Kontroll siRNA transfiziert. Des Weiteren wurde nach 24 h die Caspase 3/7 Aktivität unter Verwendung des Caspase-3/7 Assays von Promega bzw. die Zellvitalität durch den CellTiterBlue Assay (Promega) bestimmt. Nach 72 h wurden im Überstand Antikörper durch spezifische ELISA quantifiziert.

2.7. Bestimmung der Zellvitalität und Proliferationsaktivität

Der Nachweis von Zellvitalität, Apoptose und Proliferation erfolgte in dieser Arbeit über den Einsatz von Substrat-abhängigen Assays. Dabei werden die Zellaktivitäten indirekt über die

Detektion von Fluoreszenz bzw. Chemolumineszenz bestimmt. In allen verwendeten Assays wurde jeweils eine Hintergrundkontrolle verwendet, welche als Referenz für die Berechnung diente.

2.7.1. CellTiterBlue Assay

Für die Bestimmung der Zellvitalität nach der siRNA Transfektion wurde der *CellTiter Blue Assay* von Promega verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Diese Methode basiert auf der metabolischen Kapazität von lebenden Zellen, den Farbstoff Resazurin zu Resofurin zu reduzieren, welches wiederum Fluoreszenzlicht emittiert. Tote bzw. apoptotische Zellen, verlieren diese Fähigkeit. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit dem Fluorometer PolarStar (BMG Labtech, D) bei 560_{Ex}/590_{Em} nm gemessen. Als Kontrollen dienten zum einem Kontroll-siRNA (siehe 2.6.5.) transfizierte Zellen sowie Ansätze ohne Zellen (Hintergrundkontrolle).

2.7.2. Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay

Die Induktion apoptotischer Mechanismen wurde indirekt über die Messung einer vorhandenen Caspase-Aktivität bestimmt. Dabei wurde der *Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/-7 Assay* (Promega, D) verwendet. Das angewendete Protokoll richtete sich nach den Herstellerangaben. Diese Methode erlaubt, vergleichbar mit dem *CellTiterBlue Assay*, den Aktivitätsnachweis der Caspasen-3/ -7 über Fluoreszenz bestimmter Wellenlänge. Dabei wird das nicht-fluoreszierende Substrat Z-DEVD-R110 durch die Aktivität der Caspase-3/7 geschnitten, und emittiert darauf Licht von 510 nm Wellenlänge. Als Hintergrundkontrolle wurde das Substrat zusammen mit dem Zellkulturmedium inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen welche mit dem organischen Lösungsmittel DMSO behandelt wurden sind.

2.7.3. Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemilumineszent)

Die Proliferationsaktivität von Zellen erfolgte mittels des *Cell Proliferation ELISA, BrdU* von Roche unter Beachtung der Herstellerangaben. Dabei wird die Proliferation über den Einbau von BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridin) in die sich replizierende DNA bestimmt. Dieses Pyridinanalogon wird anstatt Thymidin in die DNA eingebaut. Durch den Einsatz von spezifischen Anti-BrdU-Antikörpern, die mit dem Enzym Peroxidase (POD) konjugiert sind,

kann über Chemolumineszenz der Einbau gemessen und quantifiziert werden. Die Lichtemission wurde im Luminometer LumiStar (BMG Labtech, D) bestimmt. Als Referenz wurde die Hintergrundkontrolle bestehend aus Kulturmedium, BrdU and Anti-BrdU-POD Antikörper genutzt. Diese durfte den Wert von 500 rlu/s nicht übersteigen. Zusätzlich wurden Zellen zusammen mit dem Proliferationshemmer Hydroxyurea (0,5 mM) inkubiert um Kontaminationen mit proliferierenden Zellen auszuschließen.

2.8. Quantitativer Nachweis von Serumimmunglobulinen durch ELISA

2.8.1. Konzentrationsbestimmung von Serumimmunglobulinen

Der *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)* ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung Antigen-spezifischer Antikörper in Serum oder Zellkulturüberständen.

Die OVA-spezifischen bzw. Gesamt-Immunglobuline der Isotypen IgE, IgG1 und IgG2a im Serum der Tiere wurden in dieser Arbeit mit einem *Sandwich ELISA* ermittelt. Hierzu wurde eine 96 Well Flachbodenplatte mit 50 µl des Antigen OVA (OVA Grade V, Sigma, D) verdünnt in 0,1 M NaHCO₃ beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit Waschpuffer (PBS+1% Tween 20) 5x gewaschen und mit Blockpuffer (1% PBS+1% BSA) zum absättigen der übrigen Bindungsstellen, für 2 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte erneut 5x gewaschen und die Proben verdünnt (siehe Tab.11) und aufgetragen. Zur Ermittlung der Konzentration wurde gleichzeitig eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentration (Standard) auf die Platte aufgetragen. Die Verdünnung der Proben, des Standards, sowie der eingesetzten Antikörper erfolgten im Waschpuffer. Die Platte wurde daraufhin bei 4°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die Platte wiederum gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Danach erfolgten die Zugabe des biotinylierten Sekundärantikörpers und die Inkubation bei RT für 2 h. Nach erneutem fünfmaligem Waschen und der Zugabe des Streptavidin-Peroxidase-Komplexes (1:1000 in Waschpuffer verdünnt) wurde die Platte bei Dunkelheit für 30 min. inkubiert. Anschließend wurde 100 µl des POD-Substrates zugeben und solange inkubiert, bis sich die Abstufungen der Standardverdünnungen deutlich von der Hintergrundkontrolle (Waschpuffer) abgehoben. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 M Schwefelsäure gestoppt, und die Fluoreszenz am TecanReader

(Tecan, D) bei 450 nm gemessen. Die Auswertung erfolgt mittels Magellan Software (Tecan, D). Für die Bestimmung der Gesamt-Immunglobuline der Isotypen IgG1 und IgE wurde die Platte anstatt mit OVA mit entsprechenden Erstantikörpern inkubiert (siehe Tab. 11)

OVA-spezifische Ig	IgE	IgG1	IgG2a
OVA- Grade V	20 µg/ml	0,4 µg/ml	20 µg/ml
1. Standard	200 ng/ml	50 ng/ml	10 ng/ml
Probenverdünnung	1:10	1: 2x ⁴	1:2000
Biotinylierter Ak	1:200	1:200	1:200
Gesamt-Ig	IgE	IgG1	
Erstantikörper	1:1500	1:250	
1. Standard	250 ng/ml	500 ng/ml	
Probenverdünnung	1:10-100	1: 10 ⁵⁻⁶	
Biotinylierter Ak	1:200	1:200	

Tab. 11: Verdünnungen der eingesetzten Reagenzien im ELSIA.

2.8.2. Nachweis von NGF im Überstand von stimulierten MNCs

Zum Nachweis der NGF-Produktion wurde das NGF E_{max} ImmunoAssay System von Promega eingesetzt. Bei der Durchführung wurde das Herstellerprotokoll verwendet.

2.9. Histologie von Gewebsschnitten

2.9.1. Anfertigung von Gewebsschnitten

Für die Herstellung von Gewebsschnitten wurde nach Tötung des Tieres die Lunge perfundiert und mit 1ml einer 1%igen Einbettlösung (Tissue Tekk, Sakura, USA) gefüllt und abgebunden. Die Milz wurde nach Entnahme von Fettresten gereinigt. Beide Organe wurden anschließend in ein Schälchen mit O.C.T. Medium (Sakura, USA) gebettet und mittels Trockeneis tiefgefroren. Die Lagerung der Organe erfolgte bei -80 °C. Die Anfertigung der Gewebsschnitte erfolgt an einem Kryostat bei ca. -16 °C. Dabei wurden Gewebsschnitte von 10 µm Dicke hergestellt. Diese wurden auf SuperFrost Ultra Plus-Objekträgern (Menzel-Gläser, D) aufgezogen und 2 Stunden luftgetrocknet. Anschließend wurden sie für 10 min. in -20°C kaltem Aceton fixiert und im Abzug getrocknet. Die Gewebsschnitte wurden in speziellen Plastikbehältern bei -80°C bis zur Färbung aufbewahrt.

2.9.2. Immunfluoreszenzfärbung

Für die Färbung von Antikörper-sezernierenden Zellen (*ASC-Antibody secreting cells*) wurden Antikörper verwendet, welche direkt mit einem FITC-Fluorochrom konjugiert waren. Dazu wurden die Objektträger mit den Gewebsschnitten zunächst auf Eis aufgetaut und 10 min. in kaltem PBS rehydriert. Dies diente der Entfernung von Resten des Einbettmediums. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Wachsstift (Dako Cytomation) umkreist, und für 10 min. mit einem Fc-Block (10 µg/ml in PBS + 3%BSA), bei 4°C inkubiert. Für die Minimierung einer unspezifischen Hintergrundfärbung wurden die Schnitte zusätzlich 2 h mit PBS + 3%BSA geblockt. Die Inkubation der Färbeantikörper (5-10 µg/ml) erfolgte bei 4°C einer feuchten und dunklen Kammer über Nacht. Der Nachweis der ASCs im Gewebe erfolgt über eine κ/λ -spezifische Färbung. Dafür wurden die FITC-konjugierten Antikörper Anti-Maus Kappa (SouthernBiotec, D) und Anti-Maus Ig $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ L chain (BD, D) benutzt. Nach der Färbung wurden die Schnitte 3x für je 10 min. mit PBS gewaschen und anschließend mit Glycerol/Gelantine (Sigma Aldrich, D) und einem Deckgläschen (Menzel-Gläser, D) eingedeckt.

2.9.2. Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Als Übersichtsfärbung für die Lunge wurde die Hämatoxylin-Eosin Färbung durchgeführt. Dabei wird über die Bindung des basophilen/azurophilen Farbstoffs Hämatoxylin an negativ geladene Phosphatgruppen Zellkerne blau angefärbt. Das Eosin wiederum hingegen bindet an positiv geladene Gruppen der Proteine und führt somit zu einer violetten Anfärbung des Zytoplasmas. Für diese Färbung wurden die Lungen der Tiere direkt über die Gabe von 1 ml Paraformaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöckchen wurden mittels Mikrotom in 6 µm dicke Dünnschnitte geschnitten. Diese wurden zunächst 2 h bei 60°C inkubiert und anschließend 20 min. in Xylolersatz entparaffiniert, und Anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (je 5 min 100%, 90%, 80%, 70% Ethanol, A.dest.) rehydriert. Die Schnitte wurden danach für 10 min. in Hämatoxylin nach Gill III gegeben und mit Leitungswasser für 10 min gewaschen. Nach anschließender Spülung mit A.dest erfolgte die Färbung mit Eosin für 5 min. Nach abschließendem Waschen mit A.dest. wurden die Schnitte nach der Färbung mittels aufsteigender Alkoholreihe (70-100% Ethanol) und Xylolersatz entwässert und mit Histomount eingedeckt.

2.9.3. Nachweis apoptotischer Zellen in Gewebsschnitten

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte in Paraffin-eingedeckten Lungenschnitten mittels *In situ Cell Death Detection Kit, POD* (Roche, D) nach Herstellerangaben. Diese Methode basiert auf der *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)* Technologie, bei welcher die in der Apoptose erzeugten DNA-Strangbrüche über freie 3'-OH Enden mit modifizierten Nukleotiden und einer Enzymreaktion spezifisch angefärbt werden können. Dafür wurden Gewebsschnitte der Lunge wie in 2.9.2. beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Die Schnitte wurden anschließend in 0,1 M (pH 6.0) Citratpuffer aufgekocht und mit A.dest. abgekühlt und mit einem Blockpuffer für 30 min. geblockt. Da bei dieser Methode die Farbreaktion über das Enzym Peroxidase erfolgt und diese endogen in jeder Zelle vorhanden ist, wurden die Schnitte zusätzlich für 10 min. mit 3%iger H₂O₂/Methanol-Lösung inkubiert. Dies diente der Inaktivierung der Peroxidasen. Danach wurde der TUNEL-Reaktionsmix zugegeben und bei 37°C 1 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte in 4x PBS gewaschen und mit der Converter-POD-Lösung (enthält Anti-FITC Antikörper konjugiert mit Peroxidase) für weitere 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach mehrmaligen Waschen wird das Farbsubstrat (DAB, Vector Laboratories, D) zugeben und für 10 min. bei RT inkubiert, gewaschen und mit Nuclear Fast Red Farbstoff gegen gefärbt.

Die Auswertung aller oben beschriebenen Methoden wurden mittels BX51-Mikroskop und CellF-Software von Olympus durchgeführt.

2.10. Western Blot

Zum Proteinnachweis wurden die Zellen wie in 2.5.2. beschrieben isoliert und in M-PER Puffer + 0,1 % Triton X-100 (Pierce, D) aufgenommen. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min. bei 24.100 x g und 4°C wurde der Überstand (Proteinfraktion) in ein neues Eppi überführt. Die Konzentration wurde über den Abgleich gegen das Protein BCA bestimmt. Die Proteinfraktion wurde danach in einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Von jeder Probe wurde eine definierte Konzentration (15 µg/µl) eingesetzt. Das Gel wurde nach dem Lauf auf eine Nitrocellulosemembran geblottet, und diese 1 h mit PBS + 10% Milchpulver geblockt. Die Inkubation der Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Dabei wurden beide Antikörper, Anti-Maus TrkA und Anti-Maus TrkC (Santa Cruz Biotechnology, USA), 1:200 im Blockpuffer verdünnt. Die Membran wurde anschließend dreimal mit TBS-

Puffer für 15 min. gewaschen und mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:2000), in PBS + 0,1 % Tween 20 verdünnt, für 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut dreimal gewaschen, und mittels *Western blotting Luminol Reagent* (Santa Cruz Biotechnology, USA) einem aufgelegtem Hyper-Films (Amersham Bioscience, D) belichtet.

2.11. Statistische Auswertung

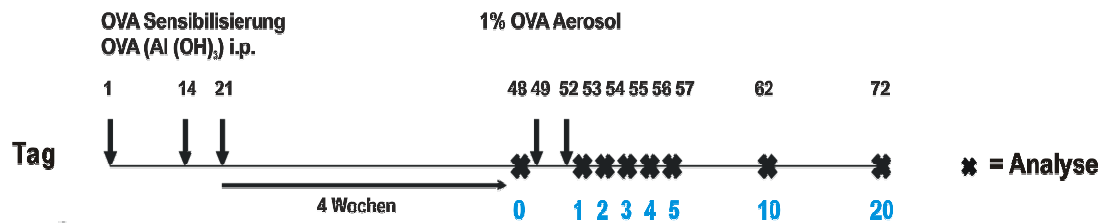
Die graphische und statistische Auswertung der Daten in dieser Arbeit wurde mit der GraphPad Prism[®] Software durchgeführt. Es werden dabei alle Werte als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Ein p-Wert von ≤ 0.05 wurde als signifikant festgelegt.

3. Ergebnisse

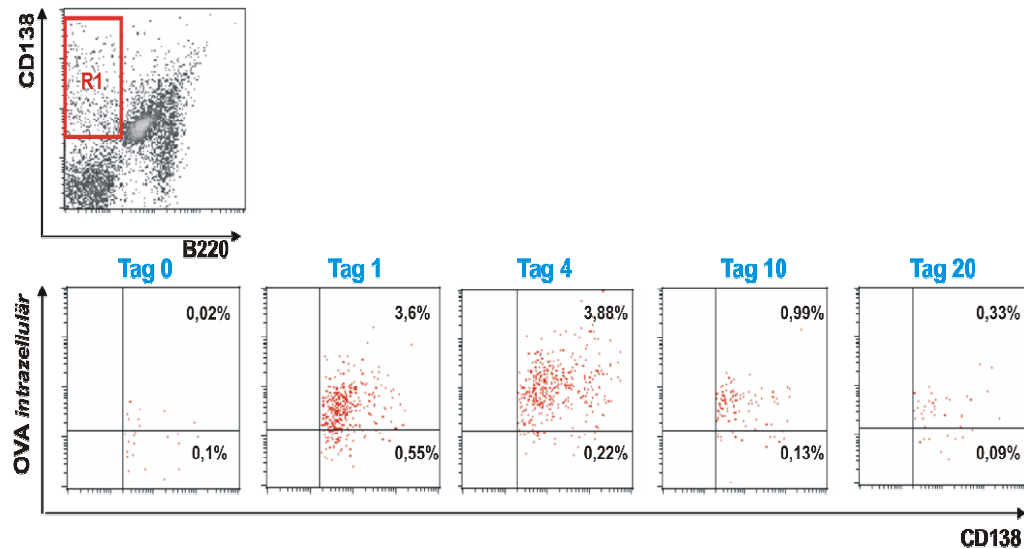
3.1. Kinetik Allergen-spezifischer Plasmazellen in der allergischen Atemwegsentzündung

Die Produktion Allergen-spezifischer Antikörper durch Plasmazellen nimmt eine zentrale Rolle bei der Entstehung allergischer Entzündungen ein. Die lokale Anwesenheit dieser Zellen in der Lunge ist hierbei von wichtiger Bedeutung. Für die Bestimmung der Anwesenheit pulmonaler Allergen-spezifischer Plasmazellen in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf wurde daher eine Kinetik durchgeführt. Dafür wurden Balb/c Mäuse wie in 2.2.2. beschrieben, zunächst mit OVA/Al(OH)₃ systemisch, mittels intraperitonealer (i.p.) Applikation, sensibilisiert. Darauf erfolgte eine zweimalige OVA-Aerosolbehandlung im Abstand von drei Tagen. Nach letztmaliger OVA-Aerosolbehandlung wurden die Lungen der Tiere (n=5) an den darauffolgenden Tagen (1, 2, 3, 4, 5, 10 und 20) durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abb.3.1a). Da bei der systemischen Immunsisierung der Tiere gegen OVA bereits eine erste Immunantwort stattfindet, wurden ausschließlich sensibilisierte Tiere als Referenz eingesetzt. Ihre Analyse erfolgte 24 h vor der ersten OVA-Aerosol-Behandlung. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag 0 definiert. Für die quantitative Analyse der Plasmazellen wurden zunächst Einzelzellsuspensionen der Lungen hergestellt (siehe 2.3.) und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen CD138 und B220 (siehe 2.4.2.) auf der Oberfläche gefärbt. Zur Identifizierung der Allergen-spezifischen Plasmazellpopulation erfolgte danach eine intrazelluläre Färbung mittels OVA-Cy5. Während der durchflusszytometrischen Messung im FACS wurde so anschließend auf alle CD138⁺ und B220^{neg} Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation ein Analysefenster (Gate) gesetzt. Daraus wurde dann der prozentuale Anteil der OVA⁺-spezifischen Plasmazellen an der Gesamtzellzahl der gemessenen mononukleären Zellen (pro Probe und Messung jeweils 1x10⁴ Zellen) bestimmt. In Abbildung 3.1b sind exemplarisch charakteristische Plasmazellfärbungen der Lunge an verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, 1, 4, 10 und 20) dargestellt. Als Kontrolle für die Spezifität der intrazellulären OVA-Cy5 Färbung wurden naive Balb/c Mäuse verwendet, und hinsichtlich OVA-spezifischer Plasmazellpopulationen untersucht (siehe Abb. 3.1c).

a)



b)



c)

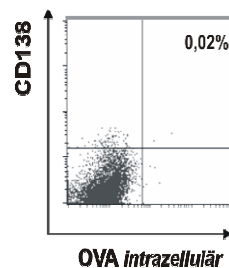


Abb. 3.1.: Durchflusszytometrische Analyse von Plasmazellen im zeitlichen Verlauf der allergischen Atemwegsentzündung. Für eine quantitative Bestimmung pulmonaler Plasmazellen wurden Lungen OVA-sensibilisierter (Tag 0) und OVA-Aerosol behandelter Balb/c Mäuse (n=5) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 1, 2, 3, 4, 5 und 10) mittels FACS analysiert (a). Als Plasmazellen wurden CD138⁺/B220⁻ Zellen definiert. Diese wurden weiterführend über eine intrazelluläre Färbung mit OVA-Cy5 quantitativ analysiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der OVA-spezifischen Plasmazellen an der gemessenen Gesamtzellzahl (1×10^4 Zellen pro Probe) der MNCs bestimmt. Intrazelluläre Färbung der Lungen naïver Mäuse mit OVA-Cy5 diente als Kontrollfärbung (c).

3.1.1. Reduktion der Anzahl Allergen-spezifischer Plasmazellen in der Lunge in Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs.

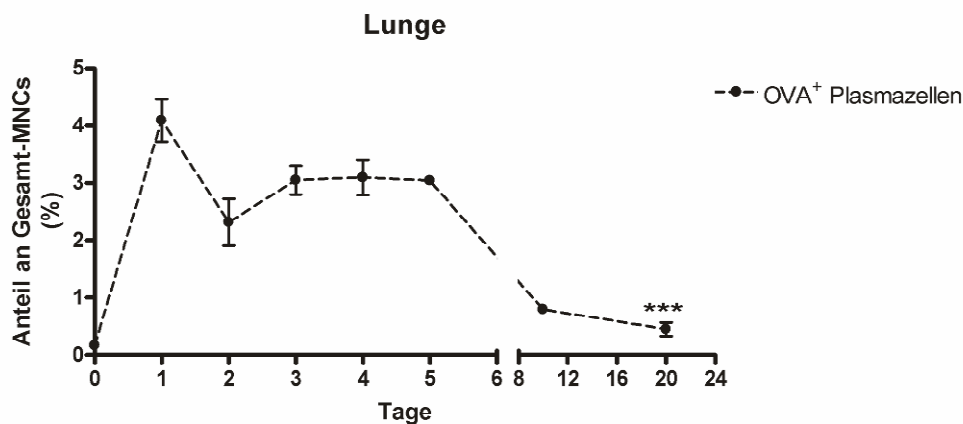
Für die quantitative Analyse Allergen-spezifischer Plasmazellen im Verlauf der allergischen Atemwegsentzündung wurden diese wie bereits beschrieben mittels spezifischer Oberflächen- (CD138/B220) bzw. Intrazellulärfärbung (OVA-Cy5) identifiziert und ihr prozentualer Anteil durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei zeigten sich im zeitlichen Verlauf deutliche Unterschiede in der Anzahl dieser Zellen. In den OVA sensibilisierten Referenztieren (Tag 0) betrug der prozentuale Anteil an OVA⁺ Plasmazellen innerhalb der MNC-Population deutlich unter einem Prozent ($0,14 \pm 0,02$ %). Nach zweimaliger OVA-Aerosol-Behandlung konnte aber eine starke Zunahme OVA⁺ Plasmazellen in der Lunge der Tiere detektiert werden. So war 24 h nach letztmaliger OVA-Aerosolgabe (Tag 1) ein Anstieg der Zellen auf $4,09 \pm 0,36$ % zu verzeichnen. Dieser reduzierte sich an Tag 2 um die Hälfte ($2,31 \pm 0,4$ %) und nahm an den Tagen 3 ($3,05 \pm 0,25$ %), 4 ($3,095 \pm 0,30$ %) und 5 ($3,03 \pm 0,05$ %) einen konstanten Wert von durchschnittlich 3 % der MNCs an (siehe Abb.3.1.1a). Im weiteren Verlauf jedoch reduzierte sich ihr Anteil signifikant gegenüber den vorherigen Tagen. So betrug ihr Anteil an den Tagen 10 und 20 nur noch geringe $0,79 \pm 0,08$ und $0,45 \pm 0,06$ % (siehe Abb. 3.1.1a).

Während des gesamten Zeitraums konnte auch eine Dynamik in der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulation in den Lungen der Tiere beobachtet werden. Die quantitative Bestimmung dieser Zellen erfolgte dabei durch die Verwendung von T-Zell-spezifischen Markern (2.4.2.). So wurden Antikörper gegen den Pan-T-Zellmarker CD3 und gegen die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 verwendet. In der sich anschließenden FACS-Messung erfolgte zuerst die generelle Einteilung der T-Zellen über den CD3 Oberflächenmarker und nachfolgend die Identifizierung CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen innerhalb der CD3⁺-Zellpopulation. Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls durch die Ermittlung des prozentualen Anteils an der gemessenen MNC-Fraktion (1×10^4 Zellen pro Probe). In den Lungen der Referenztiere konnten so an Tag 0 bereits geringe CD4⁺ ($5,11 \pm 0,85$ %) und CD8⁺-spezifische T-Zellpopulationen ($1,57 \pm 0,40$ %) gemessen werden. Deren Anteil stieg ebenfalls nach der OVA-Aerosolinhalation stark an. An Tag 1 bildeten die CD4⁺ T-Zellen $9,95 \pm 1,14$ % und die CD8⁺ T-Zellen $2,71 \pm 0,22$ % aller MNCs der Lunge. Nach 48 h (Tag 2) erreichte der Anteil der CD4⁺ T-Zellen in der Lunge mit $11,77 \pm 0,49$ % seinen höchsten Wert. Im weiteren Verlauf aber nahm der Anteil der CD4⁺ T-Zellen, vergleichbar mit den OVA⁺ Plasmazellen stetig ab (Tag 3: $9,64 \pm 0,60$ %; Tag 4: $8,74 \pm 0,59$ % und Tag 5: $7,53 \pm 0,97$ %). Des Weiteren reduzierte sich ihr Anteil in der Lunge an den Tagen 10 und 20 signifikant auf $7,55 \pm 1,43$ und $6,41 \pm 0,82$

% verglichen mit den Tagen 2 und 3 (siehe Abb. 3.1.1b). Der Anteil der $CD8^+$ T-Zellen dagegen sank bereits ab Tag 1. Er betrug an den Tagen 2, 3 und 4 jeweils nur noch $2,45 \pm 0,48\%$, $1,94 \pm 0,16\%$ und $1,66 \pm 0,07\%$ der MNC-Population. An den Tagen 5 ($1,95 \pm 0,27\%$) und 10 ($2,36 \pm 0,67\%$) nahm der Anteil der Zellen wieder leicht auf durchschnittlich 2 % zu (siehe Abb. 3.1.1a), reduzierte sich aber an Tag 20 auf $1,85 \pm 0,05\%$ im Vergleich zu Tag 1.

Insgesamt gesehen zeigte sich, dass es direkt nach der Behandlung mit OVA-Aerosol zu einer starken Zunahme von Allergen-spezifischen Plasmazellen sowie $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen in der Lunge kam. Dabei erreichte der Anteil der OVA-spezifischen Plasmazellen ab Tag 3 ein Plateau und sank mit fortschreitender Zeit ohne weiteres OVA-Aerosol wieder stark ab. An den Tagen 10 und 20 nach letztmaliger Provokation waren so nur noch geringe Mengen von OVA^+ Plasmazellen nachweisbar. Dieser Verlauf ist vergleichbar mit dem der $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ T-Zellpopulationen. Deren Anteil stieg ebenfalls nach OVA-Aerosol stark an und nahm im Verlauf der Zeit wieder drastisch ab. Im Gegensatz zu den Plasmazellen sank ihr Anteil aber nicht auf unter 1 % sondern blieb mit durchschnittlich 6 bzw. 2% stabil.

a)



b)

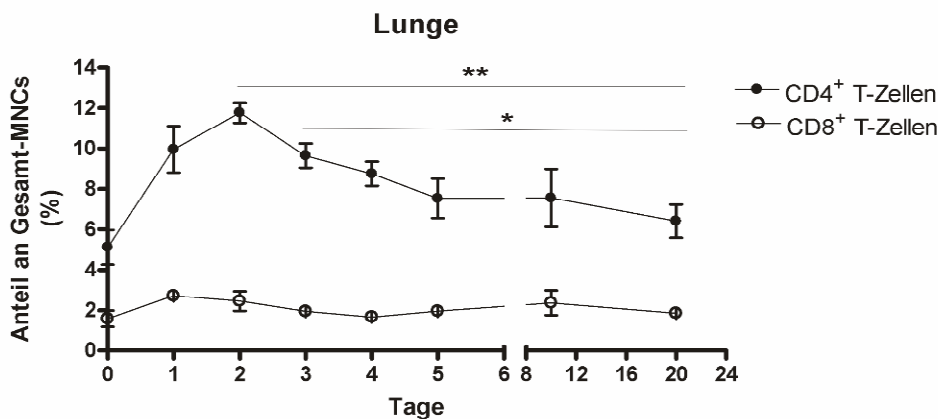


Abb. 3.1.1: Kinetik von OVA^+ Plasmazellen (a), $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen (b) in der Lunge nach OVA-Aerosolbehandlung. Dargestellt ist der jeweilige prozentuale Anteil der Zellen an den gemessenen mononukleären Zellen

(MNCs) des Organs an den Zeitpunkten 0, 1, 3, 4, 5, 10 und 20 nach OVA-Aerosol. Pro Probe wurden jeweils 1×10^4 Zellen gemessen. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Da, wie hier gezeigt, mit fortlaufender Zeit ohne erneute mukosale OVA-Provokation der Anteil der Plasmazellen insgesamt sowie der von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen signifikant abnimmt, wurde vermutet, dass die Präsenz dieser Zellen lokal in der Lunge abhängig sein muss von einem kontinuierlichen Entzündungsgeschehen. Im Folgenden wurde daher die Abhängigkeit des Plasmazellüberlebens von spezifischen, lokalen Faktoren der allergischen Atemwegsentzündung genauer untersucht. Dabei wurden die Neurotrophine als vielversprechende Kandidaten ausgewählt.

3.2. Einfluss von Neurotrophinen (NT) auf das Überleben von Plasmazellen *in vitro*

Die Proteinfamilie der Neurotrophine, insbesondere das NGF, stehen im Verdacht essentielle Regulatoren der allergischen Atemwegsentzündung zu sein. So konnte bisher im Mausmodell des allergischen Asthma eine erhöhte Produktion von NGF lokal in der allergischen Atemwegsentzündung nachgewiesen werden. NGF stellt dabei einen potenten Überlebensfaktor für eine Vielzahl von Zellen dar. Daher sollte im Folgenden die Wirkung von Neurotrophinen auf das Überleben isolierter pulmonaler Plasmazellen untersucht werden.

3.2.1 Unterschiede in der Neurotrophin-Rezeptor (Trk) Expression von Plasmazellen der Lunge, der Milz und des Knochenmarks

Für den Nachweis der Expression von Neurotrophinen und dessen Rezeptoren, den *Tropomyosin-like kinases (Trks)* in Plasmazellen wurden Balb/c Mäuse wie in 2.2.2 beschrieben gegen das Allergen OVA sensibilisiert und anschließend mit OVA-Aerosol behandelt. 24 Stunden nach finaler OVA-Aerosolbehandlung wurden die Organe Lunge, Milz und das Knochenmark präpariert (siehe 2.3.) und die $CD138^+/B220^{neg}$ Plasmazellen mittels magnetischer und fluoreszenzbasierter Methoden isoliert (siehe 2.5.). Anschließend erfolgte die Isolation und Analyse der RNA (siehe 2.6.1.) mittels RT und PCR (siehe 2.6.2-3). Als Positivreferenz diente hierbei cDNA aus Hirngewebe von Balb/c-Mäusen. Dieses Gewebe weist die Expression aller Neurotrophin-Rezeptoren und deren Liganden auf.

Die mRNA Analyse zeigte dabei bezüglich der Trk-Rezeptoren sowie deren Liganden deutliche Expressionsunterschiede in den Plasmazellen der Lunge und der Milz. Die Plasmazellen der Lunge wiesen im Gegensatz zu der Population der Milz TrkA-spezifische mRNA auf. Der TrkA-Rezeptor bindet spezifisch seinen Liganden NGF. Dagegen stellen sich als spezifische Liganden des TrkC-Rezeptors und des TrkB-Rezeptors die Neurotrophine NT3 bzw. BDNF dar. Plasmazellen der Lunge und der Milz exprimieren die mRNA für den TrkC- aber nicht für den TrkB-Rezeptor (Abb. 3.2.1.). Zur Verifizierung dieser Daten wurden von Proteinextrakten isolierter Plasmazellen der Lunge und der Milz Western Blots (siehe 2.10.) zum Nachweis der jeweiligen TrkA- und TrkC- Proteine durchgeführt. Diese bestätigten die Ergebnisse aus den Transkriptanalysen. Ausschließlich Plasmazellen der Lunge exprimierten den TrkA-Rezeptor, wohingegen beide Plasmazellpopulationen TrkC-spezifische Banden aufzeigten (in Abb. 3.2.1e exemplarisch dargestellt). Die Plasmazellen des Knochenmarks hingegen wiesen keinerlei Expression Trk-spezifischer mRNA auf, weswegen sie in den folgenden Experimenten als Negativkontrolle eingesetzt wurden (siehe Abb. 3.2.1c).

Des Weiteren wiesen die Plasmazellen der Lunge und der Milz unterschiedliche Expressionsmuster der Rezeptorliganden, den Neurotrophinen, auf. In Plasmazellen der Lunge war eine schwache mRNA Expression von BDNF und NT3, aber keine NGF-spezifische mRNA nachweisbar. Dagegen wiesen Plasmazellen der Milz nur NGF-spezifische mRNA auf (siehe Abb. 3.2.1b).

Als Kontrolle für die Reinheit der Proben wurden diese hinsichtlich der mRNA-Expression des T-Zellmarkers CD3e und des Plasmazell-spezifischen Transkriptionsfaktors Blimp1 getestet. Hierbei wiesen nur die als Positivkontrolle eingesetzten CD4⁺ T-Zellen CD3-, aber keinerlei Blimp1-Expression auf. Die Plasmazellen der verschiedenen Organe zeigten hingegen keinerlei CD3-, aber eine starke Blimp1-Expression (Abb. 3.2.1d).

Da lokale Plasmazellen in der allergischen Atemwegsentzündung den NGF-spezifischen TrkA-Rezeptor, aber nicht den Liganden NGF exprimieren, wurde in den folgenden Versuchen der Effekt von NGF auf das Überleben dieser Zellen genauer untersucht.

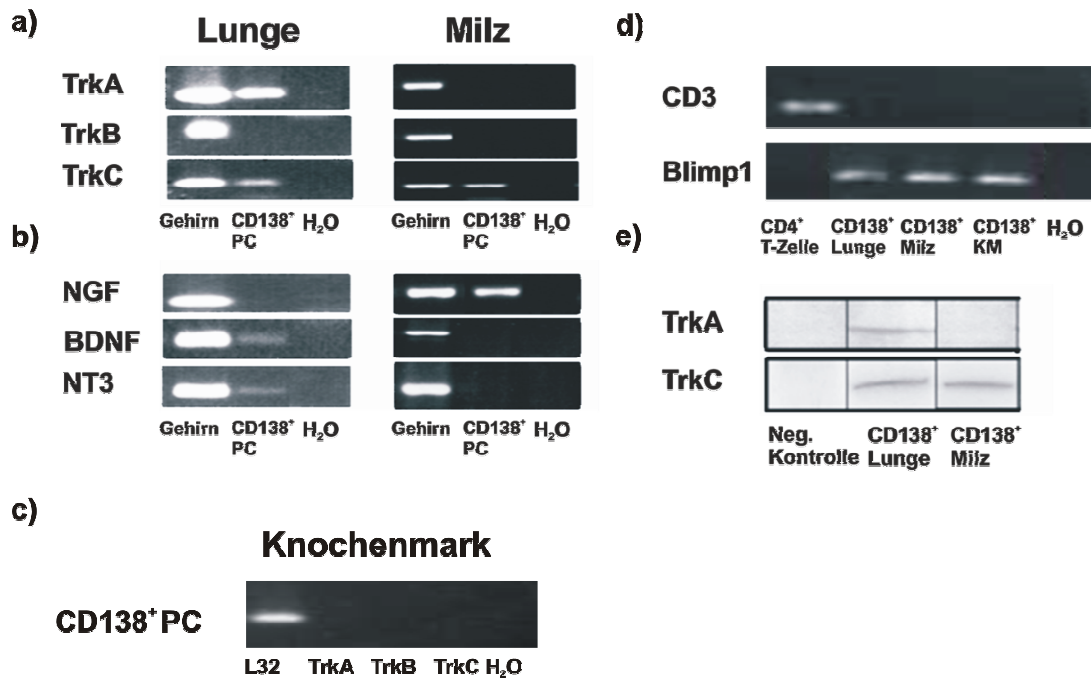


Abb. 3.2.1: Unterschiedliches Expressionsmuster der Neurotrophinrezeptoren (Trks) in Plasmazellen (PC) der Lunge, Milz und des Knochenmarks. Isolierte Plasmazellen von OVA sensibilisierten und OVA-Aerosol behandelten Mäusen wurden mittels RT-PCR hinsichtlich der Trk-Rezeptoren- und der NT-Expression analysiert. PC der Lunge wiesen im Gegensatz zur Milz eine TrkA-spezifische mRNA Expression (a) und Proteinexpression auf (e). Die PC des Knochenmarks besitzen keinerlei Trk-spezifische mRNA (c). Lungen und Milz-spezifische PC zeigten eine differenzierte NT-spezifische mRNA Expression (b). Alle Proben wurden negativ für die T-Zell-spezifische CD3 Expression getestet. Sie wiesen dagegen eine Blimp1-spezifische mRNA Expression auf (d).

3.2.2. NGF und NT3-vermitteltes Überleben von pulmonalen Plasmazellen *in vitro*

Zur Bestimmung des Einflusses von NGF auf das Überleben pulmonaler Plasmazellen wurden diese aus OVA sensibilisierten und OVA-Aerosol behandelten Mäusen (siehe Abb. 3.2.2a) isoliert und kultiviert (siehe 2.5. bzw. 2.5.3.). Die isolierten Plasmazellen wurden dafür in einem mit verschiedenen Konzentrationen von NGF und NT3 (0,5; 1; 5 und 25 ng/ml) versetztem Kulturmedium für 72 h kultiviert. Zunächst wurde mittels eines BrdU-ELISA-Tests (siehe 2.7.3.) die Proliferationsaktivität der isolierten pulmonalen Plasmazellen bestimmt. *Bromodeoxyuridine (BrdU)* ist ein synthetisches Nukleosid und wird als Thymidinanaloga verwendet. Es wird während der Replikation proliferierender Zellen in die DNA eingebaut. Über spezifische Anti-BrdU-Antikörper und eine anschließende chemische Farbreaktion ist es somit möglich das inkorporierte BrdU in den Zellen nachzuweisen. Zellen ohne Proliferationstätigkeit können BrdU nicht in ihre DNA einbauen bzw. zeigen keine spez. Chemolumineszenten Signale. Damit sollte sichergestellt werden, dass die zu beobachteten

Effekte von einem verstärkten Überleben der Zellen, und nicht durch die Kontamination mit proliferierenden Blasten verursacht werden. Die Proliferationsaktivität wurde dabei in rlu/s (*relative light units* / Sekunde) angegeben. Als untere Grenze wurden die vom Hersteller angegebenen 500 rlu/s verwendet. Zellen, bei denen sich Werte unterhalb dieser Grenze messen lassen, gelten als proliferationsinaktive Zellen. Bei der Hintergrundkontrolle (Medium, BrdU und Anti-BrdU Antikörper) bilden die 500 rlu/s wiederum die Obergrenze, um die Spezifität der Reaktion zu garantieren. Diese wurde während der Messung bzw. Berechnung automatisch von allen Proben abgezogen.

Die Messung der BrdU-Inkorporation ergab, dass sowohl unstimulierte als auch die mit Neurotrophenen behandelten kultivierten Plasmazellen Werte deutlich unterhalb von 500 rlu/s aufwiesen. In unstimulierten Kontroll-Plasmazellen (Kontrolle) konnten sowohl nach 24 h als auch nach 72 h in Kultur jeweils nur $67,25 \pm 12,17$ bzw. $45,38 \pm 8,52$ rlu/s detektiert werden (siehe Abb. 3.2.2b & c). Auch nach der Zugabe von 25 ng/ml NGF (NGF) bzw. NT3 (NT3) zum Kulturmedium war keine Steigerung des BrdU-spezifischen Signals nach 24h ($45,38 \pm 8,1$ bzw. $56,13 \pm 13$ rlu/s) und 72 h ($31,88 \pm 7,34$ bzw. $55,00 \pm 7,7$ rlu/s) in den pulmonalen Plasmazellen nachweisbar (siehe Abb. 3.2.2b und c). Im Gegensatz dazu zeigte die positiv-Kontrolle, mit 10 ng/ml *Staphylococcus aureus* cowan strain I (SAC) aktivierten B-Zellen (pos. Ko.) der Lunge, ein starkes BrdU-Signal bereits nach 24 h ($2591 \pm 436,6$ rlu/s). Dieses Signal verstärkte sich noch um ein Vielfaches nach 72 h (21770 ± 2118 rlu/s) (siehe Abb. 3.2.2b & c). Als negativ-Kontrolle wurden den isolierten pulmonalen Plasmazellen, neben 25 ng/ml NGF, 0,5 mM des Proliferationshemmers Hydroxyurea zu ihrem Kulturmedium zugesetzt (neg. Ko.). Hydroxyurea hemmt die Proliferation eventuell präsen-ter Plasmazellenvorläufer durch die Inhibierung der Ribonukleotidreduktase (RNR), was eine drastische Reduktion der Produktion von Deoxyribonukleotiden zur Folge hat (Platt OS. 2008, New Eng J Med). Die Bestimmung der Proliferationsaktivität über den BrdU-Einbau dieser Zellen nach 24 ($82,13 \pm 23,84$ rlu/s) bzw. 72 h ($115 \pm 14,9$ rlu/s) ergab keinerlei Proliferationsaktivität. Auch im Vergleich zu den NGF- und NT3-stimulierten bzw. Medium-kultivierten Plasmazellen zeigten sie keine Unterschiede im BrdU-Einbau der Zellen. Eine ebenfalls zu Beginn der Arbeit durchgeführte Färbung zum Nachweis des Proliferationsmarkers *antigen identified by monoclonal antibody* (Ki-67) zeigte keinerlei Ki-67-spezifische Signale in den kultivierten pulmonalen Plasmazellen.

Für die Bestimmung des Überlebens von lokalen pulmonalen Plasmazellen wurden diese anschließend, wie bereits beschrieben, aus der Lunge isoliert und kultiviert. Nach 72 h wurde mittels der spezifischen 7-AAD Färbung für die Identifizierung lebender und toter Zellen der

prozentuale Anteil der vitalen Plasmazellen im FACS ermittelt. Dabei wurde bei jeder Messung pro Well kontinuierlich 1×10^3 Zellen gemessen. Wie in Abbildung 3.2.2d dargestellt, ist insgesamt gesehen der Anteil lebender Zellen in den NGF und NT3 substituierten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht.

So konnte nach Zugabe von NGF und NT3 in geringer Konzentration von 0,5 bzw. 1 ng/ml bereits eine Zunahme vitaler Zellen nachgewiesen werden. Nach Zugabe von 0,5 ng/ml NGF bzw. NT3 konnten dann eine weitere Steigerung des Anteils vitaler Plasmazellen von $24,87 \pm 0,32\%$ bzw. $24,24 \pm 0,72\%$ beobachtet werden. Im Gegensatz dazu waren in der Kontrollgruppe nur noch $13,61 \pm 0,90\%$ lebende Zellen nach 72 h Kultur nachweisbar. Mit zunehmender Konzentration von NGF im Medium waren auch erhöhte Anteile lebender Zellen in der Kultur messbar. So konnte in mit 1 bzw. 5 ng/ml versetzten Kulturen eine Verdopplung der lebenden Zellen ($30,62 \pm 0,44$ bzw. $29,94 \pm 0,61\%$) beobachtet werden. Bei der höchsten Konzentration von 25 ng/ml NGF wurde mit $34,51 \pm 2,50\%$ ebenfalls der höchste Anteil lebender Zellen detektiert. Diese 2,5 fache Erhöhung des Anteils lebender Plasmazellen stellt eine signifikante Steigerung gegenüber der unbehandelten Kontrolle dar. Die Erhöhung der Konzentration von NT3 im Medium auf 1, 5 und 25 ng/ml war hingegen nicht gleichzeitig mit einem erhöhten Anteil lebender Zellen assoziiert. So konnten nach Zugabe von 1 ng/ml NT3 $27,51 \pm 0,79\%$, nach 5 ng/ml $30,78 \pm 1,31\%$ vitale Zellen nachgewiesen werden. Dieser Anteil stagnierte aber anschließend bei steigender Konzentration von 25 ng/ml ($27,44 \pm 0,61\%$).

Zusammenfassend war ein durch NGF- bzw. NT3-vermitteltes Überleben bei kultivierten, proliferationsinaktiven pulmonalen Plasmazellen nachweisbar. Dabei zeigte sich, dass man bereits bei Zugabe geringen Konzentrationen NGF bzw. NT3 eine signifikante Erhöhung des Anteils vitaler Zellen gegenüber der Kontrollgruppe erreichen konnte.

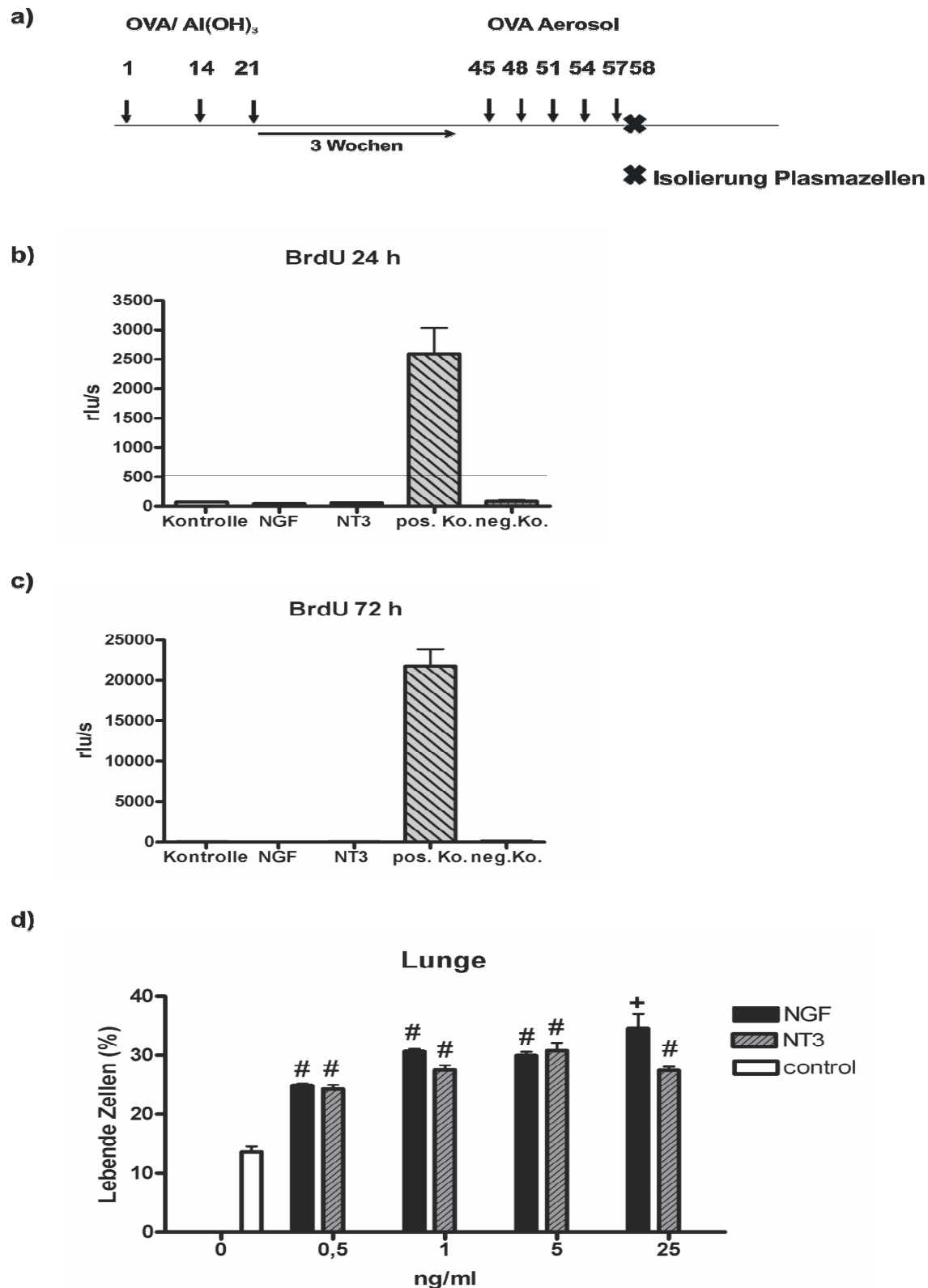


Abb. 3.2.2: NGF- und NT3-vermitteltes Überleben von pulmonalen PC *in vitro*. Pulmonale PC wurden aus OVA sensibilisierten und OVA-Aerosol behandelten Balb/c Mäusen (a) isoliert und für 72 h kultiviert. Nachweis der Proliferationsaktivität erfolgte über den BrdU-Inkorporations ELISA nach 24 (b) bzw. 72 h (c) in Kultur. Die Bestimmung lebender Zellen erfolgte über die 7-AAD Färbung und FACS-Messung. Unstimulierte (Kontrolle) sowie mit 25 ng/ml NGF (NGF) bzw. NT3 (NT3) stimulierte Plasmazellen wiesen keinerlei Proliferationsaktivität auf. Mit 0,5 mM Hydroxyurea plus 25 ng/ml NGF (neg. Ko.) kultivierte Zellen zeigten ebenfalls keine Proliferationsaktivität. Zugabe steigender Konzentrationen NGF und NT3 (0,5, 1, 5 und 25 ng/ml) zum Kulturmedium führte zu signifikant erhöhten Anteilen lebender

Zellen (d). Dargestellt ist der prozentuale Anteil vitaler Zellen an der gemessenen Gesamtzellzahl (pro Probe 5×10^3) bei dreimaliger Wiederholung des Experiments. * $p < 0.05$; + $p < 0.01$; # $p < 0.001$

3.2.3. Inhibierung des TrkA-Rezeptors auf Plasmazellen *in vitro*

Da TrkA als spezifischer Rezeptor des Neurotrophins NGF bekannt ist, sollt die Wirkung einer TrkA-Inhibierung auf das NGF-vermittelte Überleben pulmonaler Plasmazellen *in vitro* untersucht werden. Der TrkA-Inhibitor verhindert die Aktivierung des Rezeptors nach der Bindung des Liganden durch das Blockieren der Rezeptor-spezifischen ATP-Bindetasche. Nach der Isolierung der Plasmazellen (siehe 3.2.2.) erfolgte zusätzlich die Kultivierung der Zellen mit 25 ng/ml NGF unter Zugabe von 6 nmol des TrkA-Inhibitors ($IC_{50} = 6$ nM) für 72 h. Als Kontrolle für einen eventuell auftretenden unspezifischen, toxischen Effekt des TrkA-Inhibitors wurde in einem weiteren Ansatz das Medium mit einem neutralisierenden Anti-Maus-NGF Antikörper versetzt. Dieser Antikörper bindet das freie NGF, so dass es nicht für die Rezeptoraktivierung verfügbar ist. Nach 72 h erfolgte anschließend die durchflusszytometrische Analyse der Zellen. Dabei wurde der prozentuale Anteil der vitalen Zellen an der gemessenen Gesamtzahl (pro Well 1×10^3) durch eine spezifische 7-AAD Färbung bestimmt. Zum Nachweis apoptotischer Vorgänge in den TrkA-Inhibitor bzw. Anti-NGF Antikörper-behandelten Zellen wurde eine V-Annexin- und PI-spezifische Färbung durchgeführt und ebenfalls im FACS analysiert. Zum Vergleich dazu wurden primäre Plasmazellen des Knochenmarks verwendet, da diese keine Trk-Rezeptoren ausprägen und sich dadurch resistent gegenüber der Behandlung zeigen sollten.

Wie in Abbildung 3.2.3a dargestellt führte sowohl die Zugabe des TrkA-Inhibitors (NGF+Inhib: $19,86 \pm 0,37\%$) als auch die Applikation des Anti-NGF Antikörper (NGF+aNGF: Ab $18,60 \pm 0,66\%$) zum Kulturmedium zu einer signifikanten Reduktion lebender pulmonaler Plasmazellen in der Kultur verglichen mit der positiven NGF-Kontrolle (NGF: $34,51 \pm 2,50\%$). Dabei zeigten sich keine Unterschiede in der Wirkung der beiden verwendeten Antagonisten. Die Inhibition des TrkA-Rezeptors sowie die Neutralisierung des Liganden NGFs führte zu einer Verringerung des Anteils lebender Zellen, vergleichbar mit der Mediumkontrolle (med: $13,61 \pm 0,90\%$). Im Gegensatz dazu verursachte die Applikation des TrkA-Inhibitors (NGF+Inhib: $19,21 \pm 1,24\%$) keinerlei Änderung des Anteils vitaler Zellen in der Population der Knochenmarksplasmazellen (siehe Abb. 3.2.3b). Deren Anteil lebender Zellen reduzierte sich im Vergleich zur NGF-Kontrolle (NGF: $16,23 \pm 2,74\%$) aber auch zur Mediumkontrolle (med: $15,03 \pm 3,66\%$) nicht. Insgesamt betrachtet zeigten aber alle Gruppen einen starken Rückgang vitaler Zellen nach 72 h Kultur. In den beiden Zellpopulationen der

pulmonalen sowie der Plasmazellen des Knochenmarks führte die Applikation des TrkA-Inhibitors zum Medium (med. +Inhib.) zu keiner Veränderung des Anteils lebender Zellen (Lunge: $17,90 \pm 0,62\%$; Knochenmark: $20,65 \pm 2,39\%$) verglichen mit der Mediumkontrolle.

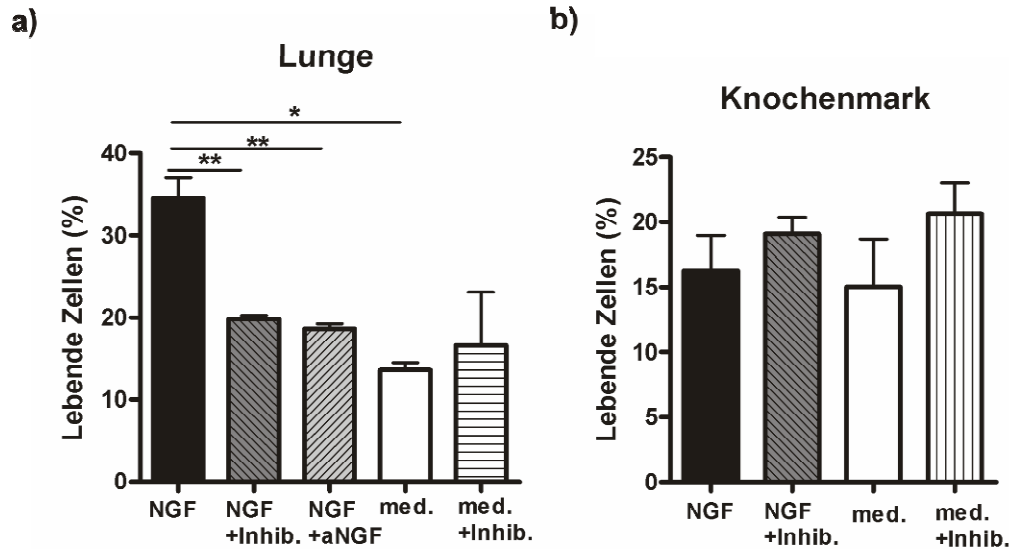


Abb. 3.2.3. Reduktion lebender pulmonaler Plasmazellen nach Inhibierung des TrkA-Rezeptors. Kultivierte Plasmazellen der Lunge und des Knochenmarks wurden mit 25 ng/ml NGF unter gleichzeitiger Gabe von 6 nmol des TrkA-Inhibitors für 72 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurden neutralisierende Anti-NGF-Antikörper in der Kultur eingesetzt. Als Referenz wurden TrkA-negative Plasmazellen des Knochenmarks verwendet. Die Analyse der Zellen erfolgte über eine 7-AAD Färbung und FACS-Messung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil lebender Zellen. Applikation des TrkA-Inhibitors zu pulmonalen Plasmazellen führte zu einer signifikanten Reduktion lebender Zellen im Vergleich zur NGF stimulierten Kontrolle (a). Der TrkA-Inhibitor führte zu keiner Veränderung der prozentualen Anzahl lebender Plasmazellen des Knochenmarks (b). Alle Experimente wurden 3 mal unabhängig voneinander durchgeführt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Die V-Annexin- bzw. PI-spezifischen Färbungen der kultivierten pulmonalen Plasmazellen ergaben dabei ein starkes V-Annexin spezifisches Signal bei den NGF/TrkA-Inhibitor behandelten Zellen (A). Ein vergleichbar starkes Signal war ebenfalls in der Mediumkontrolle detektierbar. Ein PI-spezifisches Signal, welches als ein Marker für Nekrose angesehen wird, war in keiner der gemessenen Zellen detektierbar. Verglichen dazu wiesen frisch isolierte Plasmazellen weder PI- noch V-Annexin-spezifische Signale auf (C). Sie wurden daher als vitale Zellen betrachtet. In Abb. 3.2.3c sind exemplarisch V-Annexin/PI-spezifische Färbungen der verschiedenen Gruppen dargestellt.

Zusammenfassend betrachtet konnte gezeigt werden, dass das NGF-vermittelte Überleben pulmonaler Plasmazellen durch die Blockierung des NGF-spezifischen TrkA-Rezeptors wieder aufgehoben wird. Dabei war, die Reduktion der lebenden Zellen mit einem starkem V-Annexin-spezifischen Signals verbunden.

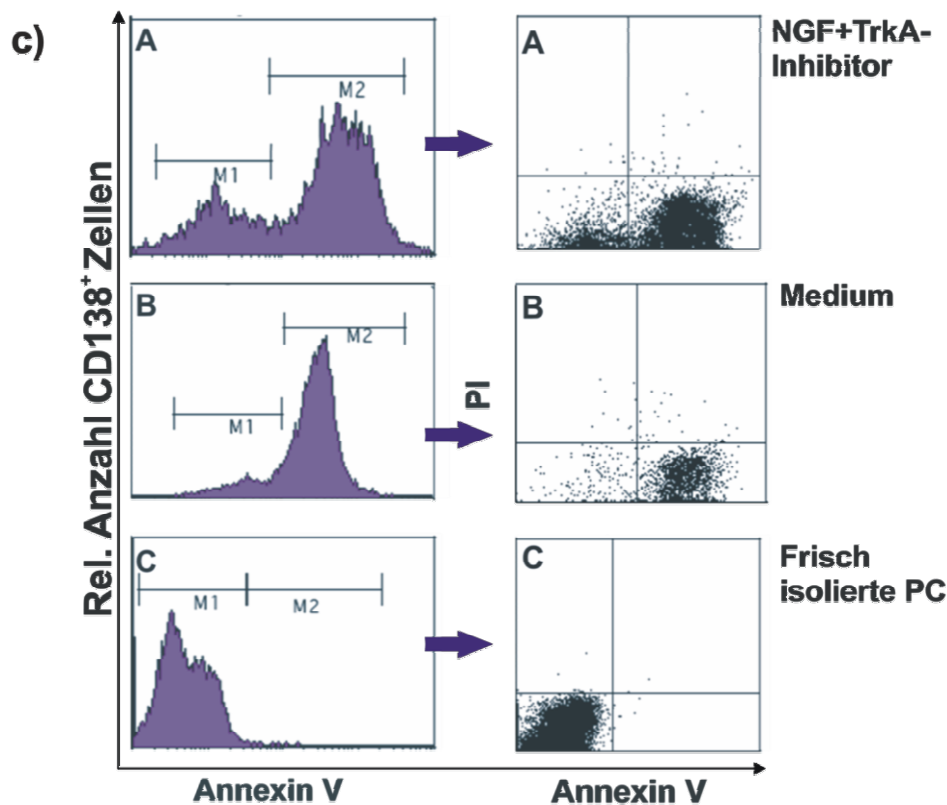


Abb. 3.2.3c: Nachweis von V-Annexin-spezifischer Signale in TrkA-Inhibitor behandelten pulmonalen Plasmazellen. Dargestellt sind repräsentative 2-D Blots mit den jeweiligen Dot-Blots von V-Annexin/PI Färbung pulmonaler Plasmazellen. M1-V-Annexin neg. Zellen; M2- V-Annexin pos. Zellen.

3.2.4. NGF-induzierte Zunahme der mRNA Expression antiapoptotischer Proteine

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob das NGF-vermittelte Überleben pulmonaler Plasmazellen mit einer veränderten Expression antiapoptotischer Proteine korreliert.

Zur Bestimmung der mRNA Expression kultivierter pulmonaler Plasmazellen wurden diese wie bereits beschrieben isoliert und anschließend für 16 h in einem mit 10 ng/ml NGF-versetzten Medium kultiviert. Nach 16 h wurde die RNA isoliert und diese in cDNA ungeschrieben. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der mRNA Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl2 und des alternativ gesplittenen XBP1(S), sowie des Überlebensfaktors IL-6 mittels qPCR. Die Normalisierung der Proben erfolgte mittels des Housekeeping-Gens L32, die Berechnung der relativen Expression und unter Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (siehe 2.6.1-4). Als Referenz für die Berechnung diente dabei die

Mediumkontrolle. Ihre relative mRNA Expression wurde als 1 definiert (siehe Abb. 3.2.4 schwarze Linie).

Der Vergleich der mRNA Expression von unbehandelten sowie NGF-stimulierten Zellen zeigte eine deutlich erhöhte Bcl2 $-(7,58 \pm 2,12)$ und XBP1(S)- $(6,69 \pm 0,34)$ Expression in den NGF-stimulierten Zellen. Die Analyse der relativen IL-6 Expression zeigte mit $2,06 \pm 0,08$ eine Verdopplung der Transkripte (siehe Abb. 3.2.4.).

Insgesamt gesehen führte die Behandlung von primären pulmonalen Plasmazellen mit NGF zu einer signifikant erhöhten mRNA Expression der antiapoptotischen Faktoren Bcl2, IL-6 und XBP1(S).

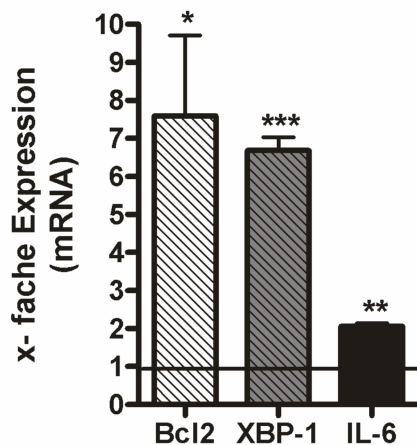


Abb. 3.2.4: Erhöhung der Bcl2-, XBP1(S)- und IL-6-spezifischen mRNA-Expression in NGF-behandelten pulmonalen Plasmazellen. Dargestellt ist die rel. Expression von Bcl2, XBP1 und IL-6 normalisiert zu L32. Stimulation mit 10 ng/ml NGF für 16 h führte zu einer signifikant erhöhten Expression von Bcl2, XBP1 und IL-6 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die rel. Expression der Kontrolle wurde auf 1 gesetzt (schwarze Linie). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3.3. Einfluss von NGF und NT3 auf die mRNA-Expression antiapoptotischer Faktoren generierter Plasmazellen *in vitro*

In den Kulturexperimenten mit pulmonalen Plasmazellen konnte nach NGF Stimulation eine erhöhte mRNA-Expression von XBP1 nachgewiesen werden. Da dieser Transkriptionsfaktor ein essentieller Regulator antiapoptotischer Mechanismen eukaryotischer Zellen darstellt, sollte im Folgenden die Auswirkung der NGF-Stimulation auf die mRNA-Expression charakteristischer Zielgene von XBP1 bestimmt werden. Dafür wurden, wie in 2.5.3 beschrieben, Plasmazellen *in vitro* aus pulmonalen B-Zellen generiert und mit 10 ng/ml NGF oder 5 ng/ml NT3 für 16 h stimuliert. Nach dem Nachweis der TrkA- bzw. TrkC-Rezeptor-Expression in den Zellen, wurde im Anschluß mittels qPCR die mRNA-Expression von XBP1(S), RelA/p65, Hspa5/Bip und Edem1 bestimmt (siehe 2.6.1-4). Die Proteine der Gene XBP1(S) und RelA/p65 sind alle maßgeblich an Signalewegen für die Aufrechterhaltung der

Proteinsynthese bzw. Zellhomöostase beteiligt und somit interessante Kandidaten für die Regulation des Plasmazellüberlebens. Insbesondere das XBP1-Protein wird als ein Plasmazell-spezifischer Faktor angesehen. Des Weiteren sollten zwei charakteristische Zielgene von XBP1, Hspa5/Bip und Edem1 untersucht werden, welche ebenfalls an antiapoptotischen Signalewegen beteiligt sind. In allen Fällen wurde zur Normalisierung der Proben das Houskeepinggen L32 verwendet. Als Vergleichsgruppe wurden primäre Plasmazellen des Knochenmarks ebenfalls für 16 Stunden mit 10 ng/ml NGF und 5 ng/ml NT3 kultiviert. Als Referenz wurden in beiden Fällen unbehandelte Plasmazellen (Ko.) benutzt. Deren relative Expression wurde als 1 definiert. (siehe Abb. 3.3a)

Wie in Abbildung 3.3a dargestellt, führte die 16 stündige Stimulation der *in vitro* generierten Plasmazellen mit NGF und NT3 zu einer signifikanten Erhöhung der XBP1(S), RelA/p65-spezifischen mRNA Expression. Ebenso konnte eine sehr starke Expressionserhöhung des von XBP1(S) regulierten Hspa5/Bip nachgewiesen werden. Dabei führte die Gabe von 10 ng/ml NGF zu einer signifikanten Erhöhung der relativen mRNA-Expression von XBP1(S) ($4,48 \pm 0,62$), RelA/p65 ($3,70 \pm 0,29$), sowie von Hspa5/Bip ($36,44 \pm 5,22$) auf. Im Gegensatz dazu war die relative Expression Edem1-spezifischer mRNA mit $0,44 \pm 0,07$ deutlich reduziert. Die Stimulation der Zellen mit NT3 (5 ng/ml) führte sowohl für XBP1(S) ($2,59 \pm 0,11$), RelA/p65 ($2,170 \pm 0,12$), Hspa5/Bip ($26,63 \pm 4,31$) als auch für Edem1 ($3,5 \pm 0,48$) zu einer signifikanten Zunahme der Genexpression (siehe Abb. 3.3a). Auffällig war dabei die drastische Zunahme der Hspa5/Bip-spezifischen Expression unter beiden Stimulationsbedingungen. Im Vergleich dazu wiesen sowohl die TrkA- als auch TrkC-Rezeptor-defizienten Plasmazellen des Knochenmarks keine Veränderung in der mRNA-Expression auf (siehe Abb. 3.3b). Ebenso konnte in NGF-stimulierten Plasmazellen des Knochenmarks keine Veränderung der Genexpression von XBP1(S) ($1,07 \pm 0,23$) RelA/p65 ($0,71 \pm 0,24$), Hspa5/Bip ($0,96 \pm 0,22$) und Edem1 ($0,90 \pm 0,29$) beobachtet werden. Dies zeigte sich ebenfalls bei NT3-stimulierten Plasmazellen des Knochenmarks. Auch bei ihnen war keine Veränderung hinsichtlich der XBP1(S) ($1,6 \pm 0,02$ rel. Expression), RelA/p65 ($0,73 \pm 0,18$ rel. Expression), Hspa5/Bip ($0,98 \pm 0,18$ rel. Expression) und Edem1 ($1,03 \pm 0,15$ rel. Expression) mRNA-Expression nachweisbar (siehe Abb. 3.3b).

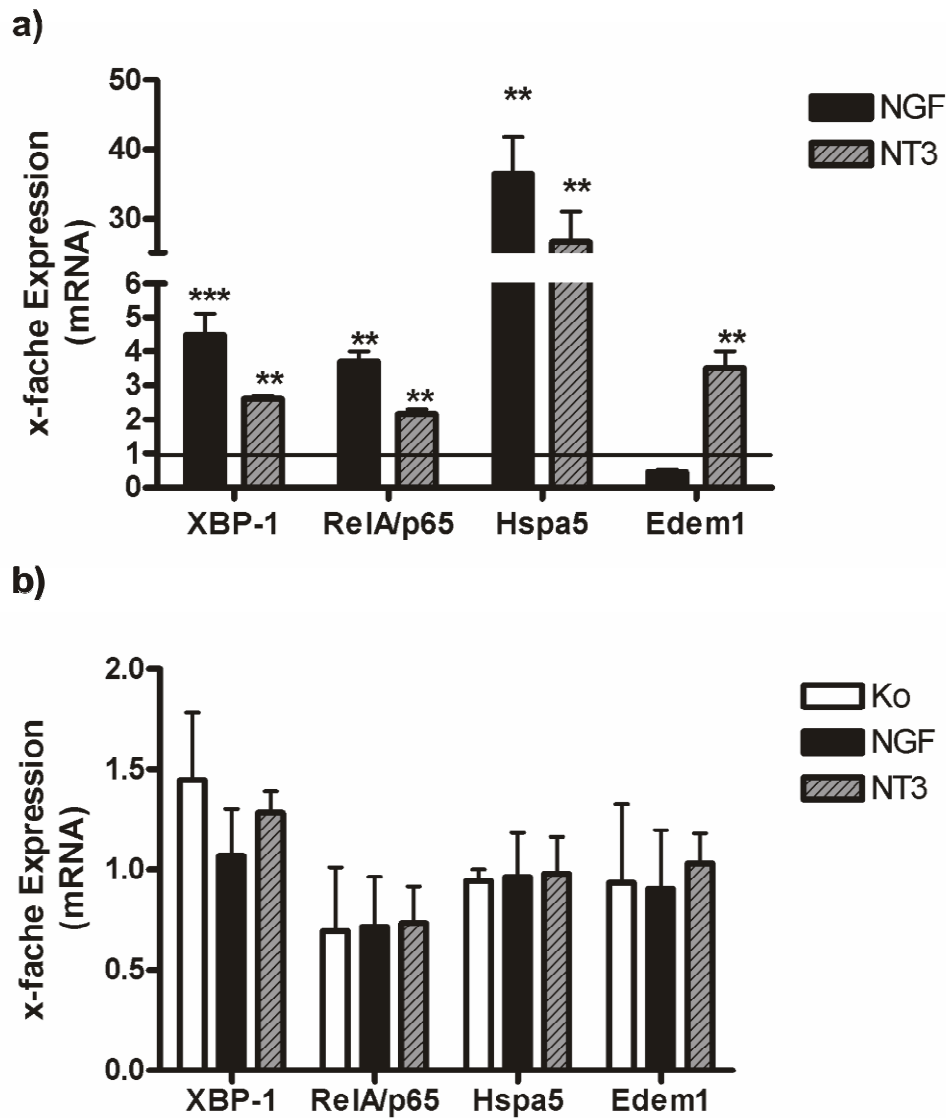


Abb. 3.3.: Unterschiedliche Regulation der mRNA-Expression von XBP1, RelA/p65, Hspa5 und Edem1 in NT3 bzw. NGF stimulierten Plasmazellen Dargestellt ist die rel. Expression von XBP1, RelA/p65, Hspa5 und Edem1 normalisiert zu L32. Stimulation mit 10 ng NGF bzw. 5ng/ml NT3 für 16 h führte zu einer signifikant erhöhten Expression von XBP1, RelA/p6 und Hspa5 in den Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. NGF-Stimulation führte zu einer Verringerung der Edem1 mRNA-Expression verglichen mit NT3-behandelten Zellen (a). Primäre Plasmazellen des Knochenmarks wiesen keinerlei Veränderung in der mRNA-Expression auf. Die rel. Expression der Kontrolle wurde auf 1 gesetzt - (a) schwarze Linie. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3.4. Bestimmung der Zellvitalität und Antikörperproduktion von siRNA-transfizierten Mononukleären Zellen (MNC)

Ein wesentlicher Marker der allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell ist die starke Produktion von NGF sowie die Ausprägung des TrkA-Rezeptors auf den Entzündungszellen des inflammatorischen Infiltrats. Inwiefern der TrkA-Rezeptor das Überleben der

mononukleären Zellen innerhalb des inflammatorischen Infiltrats beeinflusst, ist aber bisher nicht bekannt. Im Folgenden sollte daher bei MNCs der Lunge und der Milz die Rolle des TrkA-Rezeptors auf das Überleben dieser Zellen bestimmt werden.

3.4.1. Reduzierung der TrkA-Rezeptor Expression in aktivierten MNCs

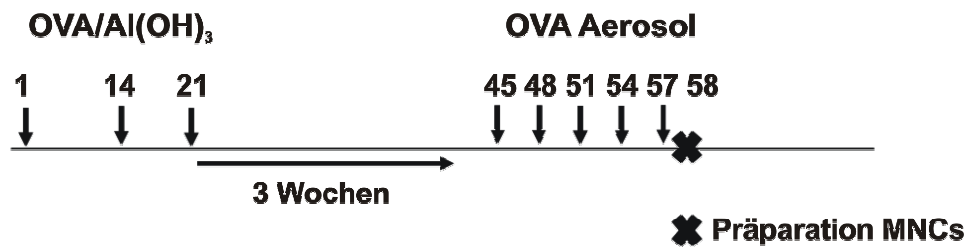
Für die Bestimmung der Rolle des TrkA-Rezeptors im Überleben von lokalen MNCs der Lunge sowie der Milz sollte eine TrkA-spezifische Expression über die Transfektion mit einer TrkA-spezifischen siRNA reduziert werden. Dafür wurden wie in Abb. 3.4.1a dargestellt Balb/c Tiere mit OVA sensibilisiert und anschließend mit OVA-Aerosol behandelt. 24 h nach der letzten OVA-Aerosol Provokation wurde die MNC-Fraktion der Lunge sowie der Milz isoliert (siehe 2.3.), in Kultur genommen und durch die Zugabe von jeweils 10 ng/ml SAC, IL-4 ng/ml und 2,5 µg/ml des Anti-CD40 Antikörpers restimuliert. Nach 7 Tagen erfolgte eine Bestimmung der NGF-Konzentration im Überstand der Kulturen durch einen NGF-spezifischen ELSIA (siehe 2.8.2.) Dabei zeigte der quantitative Nachweis von NGF im Überstand der kultivierten Zellen deutliche Unterschiede in der NGF-Produktion zwischen den beiden Organen Lunge und Milz. Während in den pulmonalen Überständen durchschnittlich $45,75 \pm 14,70$ pg/ml NGF nachgewiesen werden konnten, war in den Überständen der Milz kein Nachweis von NGF möglich.

An Tag 8 erfolgte, wie in 2.6.5. beschrieben, die Transfektion mit einer TrkA-spezifischen bzw. einer negativen Kontroll-siRNA (Kontrolle). Die neg. Kontroll-siRNA zeigte in Vorversuchen wie erwartet keinerlei Wirkung. Zur Überprüfung der Transfektion wurde nach 24 h ein Teil der Zellen geerntet, deren RNA isoliert (siehe 2.6.1-4), und hinsichtlich der TrkA-spezifischen mRNA Expression mittels qPCR analysiert. Dabei wurde die relative TrkA-Expression der Negativkontrolle als 100 % definiert. Zellen beider Organe zeigten nach der Transfektion eine Reduktion der TrkA-Expression. So verringerte sich die TrkA-spezifische mRNA Expression pulmonaler MNCs auf durchschnittlich 31,27 %, die der Milz auf 27,2 % (siehe Abb. 3.4.1b).

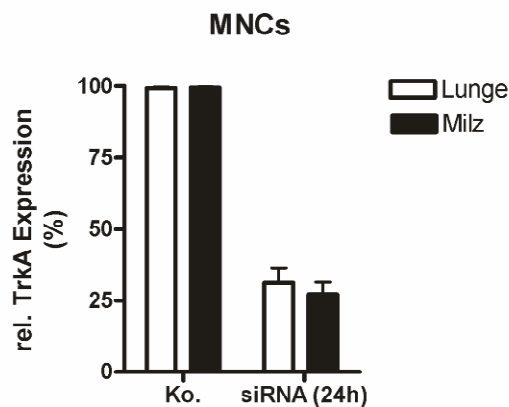
Eine zusätzliche Bestimmung der Bcl2 mRNA-Expression nach 8 bzw. nach 24 h sollte erste Hinweise über Änderungen der Zellhomöostase in den transfizierten Zellen geben. Die Transfektion der TrkA-spezifischen siRNA in den MNCs der Milz verursachte aber keine Veränderung der relativen Bcl2 mRNA-Expression nach 8 ($1,27 \pm 0,06$) als auch nach 24 h ($1,09 \pm 0,15$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ko.: $0,95 \pm 0,05$). Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Verringerung der Bcl2 spezifischen mRNA-Expression der Lunge sowohl nach

8 ($0,394 \pm 0,02$) und nach 24 h ($0,10 \pm 0,06$) im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (siehe Abb. 3.4.1c). Zum Ausschluss eines unspezifischen Effekts des Transfektionsmediums (Trans.) auf die Zellhomöostase wurde in beiden Gruppen die Bcl2 mRNA-Expression nach alleiniger Zugabe des Transfektionsmediums bestimmt. Weder die pulmonalen ($1,06 \pm 0,10$) noch die MNC-Fraktion der Milz ($1,11 \pm 0,14$) wiesen eine Veränderung in der Bcl2-spezifischen mRNA-Expression auf (siehe Abb. 3.4.1c).

a)



b)



c)

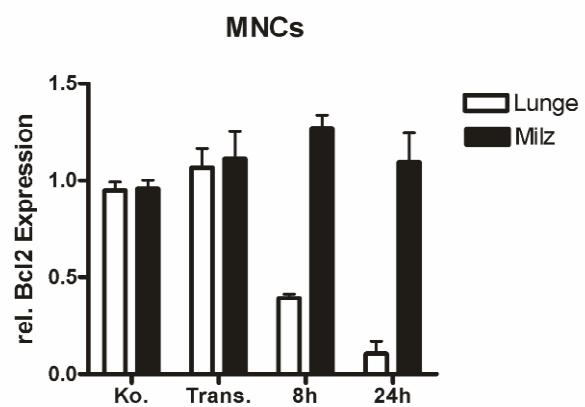


Abb. 3.4.1: Unterschiede in der Bcl2-spezifischen mRNA-Expression von aktivierten MNCs der Lunge und Milz nach TrkA-spezifischer siRNA Behandlung. Mononukleäre Zellen der Lunge und der Milz wurden von OVA-sensibilisierten und OVA-Aerosol behandelten Mäusen (a) isoliert und mittels SAC, IL-4 und Anti-CD40 Antikörpern aktiviert. Nach 8 Tagen wurden die Zellen mit TrkA-spezifischer siRNA transfiziert und anschließend die relative TrkA bzw. Bcl2-spezifische mRNA-Expression bestimmt. Dargestellt sind die relative Expression von TrkA bzw. Bcl2 mRNA zu L32. Die Transfektion der MNCs mit TrkA-spezifischer siRNA führte in beiden Organen zu einer Reduktion der TrkA-spezifischen mRNA-Expression (b). Eine Reduktion der Bcl2-spezifischen mRNA-Expression war aber nur in den MNCs der Lunge zu verzeichnen. Die MNCs der Milz wiesen keine Veränderung auf (c). Alle Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Die Inhibierung der TrkA-spezifischen mRNA Expression mittels siRNA Transfektion führte in pulmonalen aber nicht in mononukleären Zellen der Milz zu einer deutlichen Reduktion der Bcl2-mRNA Expression. Dieser Unterschied zwischen den beiden Organen sollte in weiterführenden Untersuchungen bezüglich der Zellvitalität näher bestimmt werden.

3.4.2 Bestimmung der Zellvitalität von siRNA-transfizierten MNCs

Da die Transfektion pulmonaler MNCs mit einer TrkA-spezifischen siRNA zu einer deutlichen Abnahme der Bcl2-spezifischen mRNA-Expression führte, sollte des Weiteren der Einfluss des TrkA-Rezeptors auf die Zellhomöostase dieser Zellen ausführlicher analysiert werden. Dafür wurden, wie in 3.3.1. beschrieben, die MNCs der Lunge bzw. der Milz kultiviert und mit TrkA-spezifischer siRNA transfiziert. 24 Stunden nach erfolgter Transfektion wurde anschließend die Zellvitalität der kultivierten Zellen mittels des *Cell TiterBlue*-Vitalitätsassays bestimmt (siehe 2.7.1.). Dabei wurden unbehandelte MNCs als positiv-Kontrollgruppe (pos. Ko.) eingesetzt und deren Zellvitalität als Referenz für die Berechnung verwendet.

Wie in Abb.3.4.2 a dargestellt, führte die Transfektion mit TrkA-spezifischer siRNA in pulmonalen MNCs (siRNA) verglichen zur Kontrollgruppe (pos. Ko.: $92,40 \pm 1,59$ %) zu einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität auf $31,06 \pm 2,47$ %. Die Zellvitalität der Milz-Fraktion wies mit $98,49 \pm 0,37$ % (siRNA) dagegen keinerlei Veränderung gegenüber ihrer Kontrolle (pos. Ko.: $94,14 \pm 1,29$ %) auf. Die Transfektion mit einer nicht spezifischen Kontroll-siRNA (Ko-siRNA) sowie die Zugabe des Transfektionsmediums alleine (Trans.) führten ebenfalls zu keiner Veränderung der Zellvitalität pulmonaler MNCs (Ko-siRNA: $90,14 \pm 2,21$ %; Trans: $88,74 \pm 3,69$ %) sowie der MNCs der Milz (Ko-siRNA: $87,8 \pm 0,42$ %; Trans: $89,79 \pm 0,31$ %).

Die Bestimmung der Caspase-Aktivität der Caspasen 3 und 7 sollte zusätzlich Aufschluss über die Induktion der Apoptose in den transfizierten MNCs geben. Dafür wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 mittels des *Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay* ermittelt (siehe 2.7.2.). Als Referenz für die Berechnung der relativen Caspase-Aktivität wurden MNC mit dem organischen Lösungsmittel DMSO (*Dimethylsulfoxid*) behandelt, welches dafür bekannt ist, Apoptose in Zellen zu induzieren. Die Transfektion mit der negativen Kontroll-siRNA (Ko.) bzw. mit dem Transfektionsmedium alleine (Trans.) dienten dabei wiederum als Kontrollgruppen.

Die Unterdrückung der TrkA-spezifischen mRNA in pulmonalen MNCs (siRNA) führte, wie in Abb. 3.4.2b dargestellt, zu einem fast 6-fachen Anstieg der Caspase-3- und -7-Aktivität ($88,58 \pm 3,98$ %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ko. $15,20 \pm 1,30$ %). Die Bestimmung der Caspaseaktivitäten in transfizierten MNCs der Milz (siRNA) hingegen zeigte keine Aktivitätsänderungen ($17,60 \pm 1,21$ %) gegenüber der Kontrollgruppe (Ko. $17,22 \pm 0,31$ %). Die DMSO-Zugabe führte hingegen sowohl in MNCs der Lunge als auch der Milz zu einer starken Induktion der Caspase-3- und -7-Aktivität von $98,80 \pm 0,72$ und $92,80 \pm 3,14$ % in den

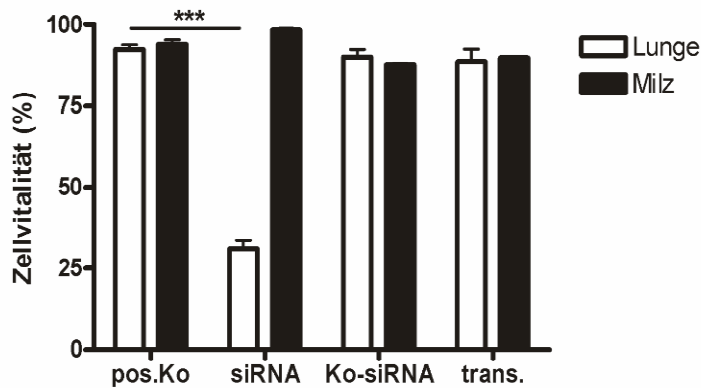
behandelten Zellen. Die alleinige Zugabe des Transfektionsmedium bewirkte keinen Anstieg in der gemessenen Caspaseaktivitäten. Diese betrug bei pulmonalen MNCs $15,86 \pm 1,78$ und bei MNCs der Milz $12,56 \pm 2,47$ %.

Die Konzentrationsbestimmung der produzierten IgG1 und IgE Antikörper (siehe 2.8.1.) der MNCs 72 h nach erfolgter siRNA Transfektion, wies nur für pulmonalen MNCs signifikante Unterschiede auf. Die Konzentration der IgG1 Antikörper im Überstand (ÜS) der Kontroll-siRNA (Ko.) betrug dabei $80,60 \pm 8,02$ ng/ml. Die Transfektion der TrkA-spezifischen siRNA (siRNA) dagegen führte zu einer 1,5fachen Reduktion der IgG1 Konzentration im Kulturüberstand ($52,72 \pm 7,49$ ng/ml). Eine Abnahme der IgG1 Konzentration im Überstand der Milz-MNCs ist nach der Transfektion mit TrkA-spezifischer siRNA hingegen nicht zu verzeichnen. Ganz im Gegenteil stieg die Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe (Ko.) von $97,46 \pm 30,36$ ng/ml auf $153,70 \pm 43,19$ ng/ml.

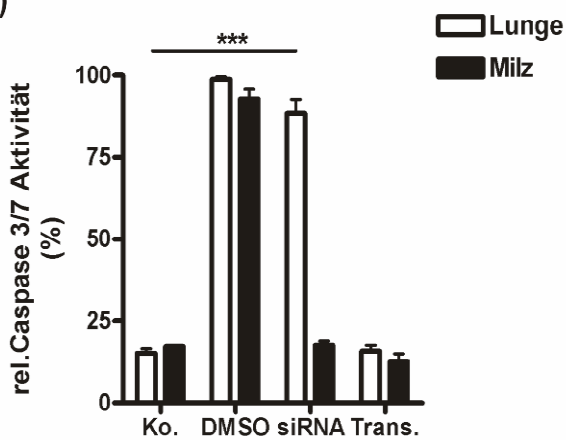
In beiden Kulturen, Lunge und Milz, konnte IgE nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Da diese aber unterhalb des Detektionslimits des ELISA lagen, wurden sie nicht berücksichtigt.

Die Reduktion der TrkA-Epression in den mononukleären Zellen der Lunge führte zusammengefasst zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität, verbunden mit einer signifikanten Zunahme der Caspase-3- und -7-Aktivität. Weiterhin war ebenfalls eine Abnahme der IgG1-Konzentration im Überstand der Kulturen zu verzeichnen (siehe Abb. 3.4.2c). Im Gegensatz dazu führte die Transfektion von MNCs der Milz zu keinerlei Veränderung der Zellvitalität, der Caspaseaktivitäten sowie der IgG1 Konzentration im Kulturüberstand.

a)



b)



c)

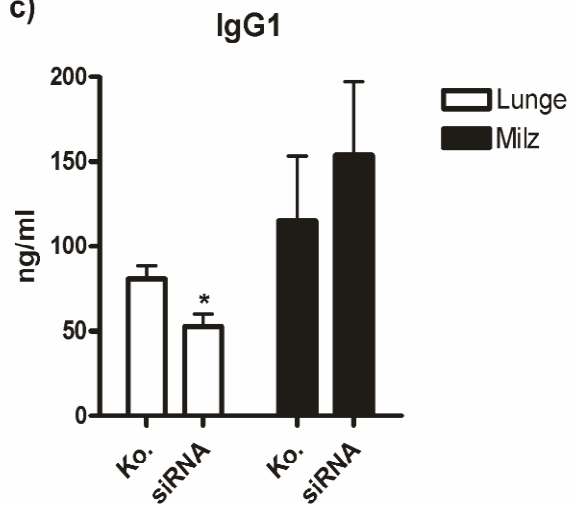


Abb. 3.4.2: Nachweis der Zellvitalität bzw. der Caspaseaktivität in TrkA-spezifischen siRNA transfizierten MNCs der Lunge und Milz. MNCs der Lunge und Milz wurden mittels SAC, IL-4 und Anti-CD40 Antikörper aktiviert und nach 7 Tagen mit einer TrkA-spezifischen siRNA (siRNA) transfiziert. Anschließend Bestimmung der Zellvitalität zeigte eine signifikante Reduktion in pulmonalen MNCs (a). Die Transfektion mit einer neg. Kontroll-siRNA (Ko-siRNA) und dem Transfektionsmedium alleine (Trans.) führte in beiden Fällen zu keiner Veränderung der Zellvitalität (a). Der Nachweis der Caspase-3/7 Aktivität ermittelte eine signifikant erhöhte Caspaseaktivität in pulmonalen MNCs (siRNA) verglichen mit den MNCs der Milz (b). Als pos. Kontrolle wurde DMSO verwendet. Behandlung mit dem Transfektionsmedium (Trans.) bzw. der neg. Kontroll-siRNA (Ko-siRNA) zeigten keine Aktivierung der Caspase-3/7 Aktivität (b). Die Konzentration der IgG1 Antikörper im Überstand pulmonaler MNCs war signifikant reduziert nach der TrkA-spezifischen siRNA Transfektion (c). Keinerlei Konzentrationsänderung konnte in MNCs der Milz detektiert werden (c). Dargestellt sind die Zellvitalität und die Caspaseaktivität in (%). Die Konzentration der IgG1 Antikörper wird in (ng/ml) angegeben. Alle Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

3.5. Einfluss des TrkA-Rezeptors auf das Überleben von Plasmazellen *in vivo*

In den vorherigen Experimenten konnte bereits die exklusive Expression des NGF-spezifischen TrkA-Rezeptors auf pulmonalen Plasmazellen nachgewiesen werden. Die Plasmazellpopulationen der Milz bzw. des Knochenmarks dagegen prägen diesen nicht aus. Des Weiteren führte die Kultivierung pulmonaler Plasmazellen mit dem TrkA-Liganden NGF zu einer gesteigerten Überlebensrate der Zellen *in vitro*. Dieser Effekt konnte aber durch die Inhibierung des TrkA-spezifischen Signalwegs aufgehoben werden und führte anschließend zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl lebender Zellen. Darüber hinaus reagierten pulmonale MNCs auf die Transfektion mit TrkA-spezifischer siRNA mit einer Abnahme der Zellvitalität und der Bcl2-spezifischen mRNA Expression, was wiederum zu einer gesteigerten Aktivität der Caspasen -3 und -7 führt. Im Folgenden sollte daher die Rolle des TrkA-Rezeptors auf das Überleben von Plasmazellen, bzw. dessen Einfluss auf die allergische Atemwegsentzündung unter Verwendung des Mausmodells des allergischen Asthmas *in vivo* untersucht werden.

3.5.1. Einfluss des TrkA-Inhibitors auf die Anzahl von Antikörper-sezernierende Zellen in der allergischen Atemwegsentzündung

Zum Nachweis der Rolle des TrkA-Rezeptors im lokalen Überleben der Plasmazellen in der allergischen Atemwegsentzündung, wurden, wie in Abb. 3.5.1a dargestellt, Balb/c Mäuse gegen OVA sensibilisiert und nach 3 Wochen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (43; 44) die allergische Atemwegsentzündung mit OVA-Aerosol inhalatorisch provoziert. An den Tagen 46 und 47 erfolgte daraufhin die lokale Gabe des spezifischen TrkA-Inhibitors (6 nmol gelöst in PBS) durch intranasale (i.n.) Applikation. Die Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge PBS/DMSO. Das ursprüngliche Lösungsmittel des TrkA-Inhibitors ist DMSO. Um einen unspezifischen toxischen Effekt von DMSO auszuschließen wurden das PBS der Kontrolltiere identisch zum Inhibitor mit DMSO verdünnt. Die Analyse der Tiere erfolgte 24 h nach letztmaliger TrkA-Inhibitorgabe.

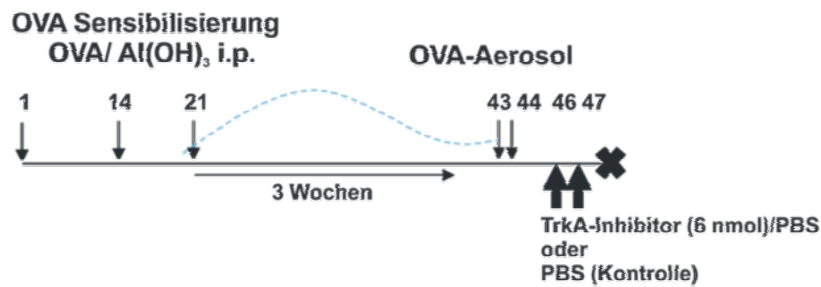


Abb. 3.5.1a: Schematische Darstellung des Behandlungsprotokolls für die *in vivo* Applikation des TrkA-Inhibitors. Der Versuch wurde 2 mal unabhängig voneinander wiederholt (n=5).

Der Nachweis von Plasmazellen in den Gewebeschnitten von Lunge und Milz erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung spezifischer FITC-markierter Anti- κ bzw. Anti- λ Antikörper (siehe 2.9.2.) Diese Antikörper erkennen spezifisch die leichten Ketten von produzierten Antikörpern. Durch die Verwendung des Fc γ -Blocks vor der Inkubation der Färbeantikörper wird eine unspez. Bindung auf Fc γ R⁺-Zellen verhindert. Dabei wurden in der Lunge die Anzahl von FITC-positiven Zellen pro Atemwegsquerschnitt und in der Milz pro ausgezähltem Gesichtsfeld unter Verwendung 20 facher Vergrößerung bestimmt. Es wurden dabei jeweils 3 Gesichtsfelder pro Tier (n=5) ausgezählt. Da Plasmazellen bzw. deren unmittelbare Vorläufer, die Plasmablasten, sich morphologisch nicht eindeutig identifizieren lassen, wurden diese insgesamt als Antikörper-sezernierende Zellen (ASCs) bezeichnet.

Die Analyse der Tiere an Tag 48 zeigte dabei eine signifikante Reduktion der ASC-Anzahl lokal in der Lunge TrkA-Inhibitor behandelter Tiere (OVA+TrkA Inhib.). Die Anzahl der ASCs pro Atemwegsquerschnitt betrug dabei geringe $5,57 \pm 2,20$ Zellen pro Atemwegsquerschnitt, verglichen mit der PBS-behandelten Kontrollgruppe (OVA) mit durchschnittlich $19,29 \pm 3,70$ Zellen. In den OVA/Al(OH)₃ sensibilisierten Mäusen (Ko.) ließen sich dagegen nur sehr geringe Zahlen an ASCs nachweisen ($0,714 \pm 0,35$ ASCs/Atemwegsquerschnitt). In Abb. 3.5.1b sind exemplarisch κ/λ -spezifische Fluoreszenzfärbungen der Lunge, sowie die statistische Auswertung aller Tiere dargestellt.

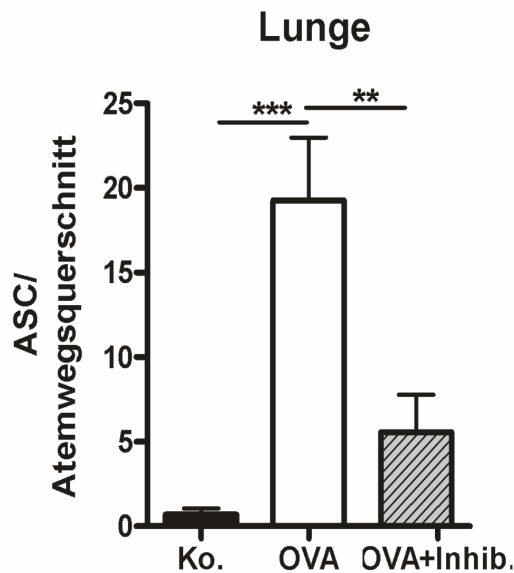
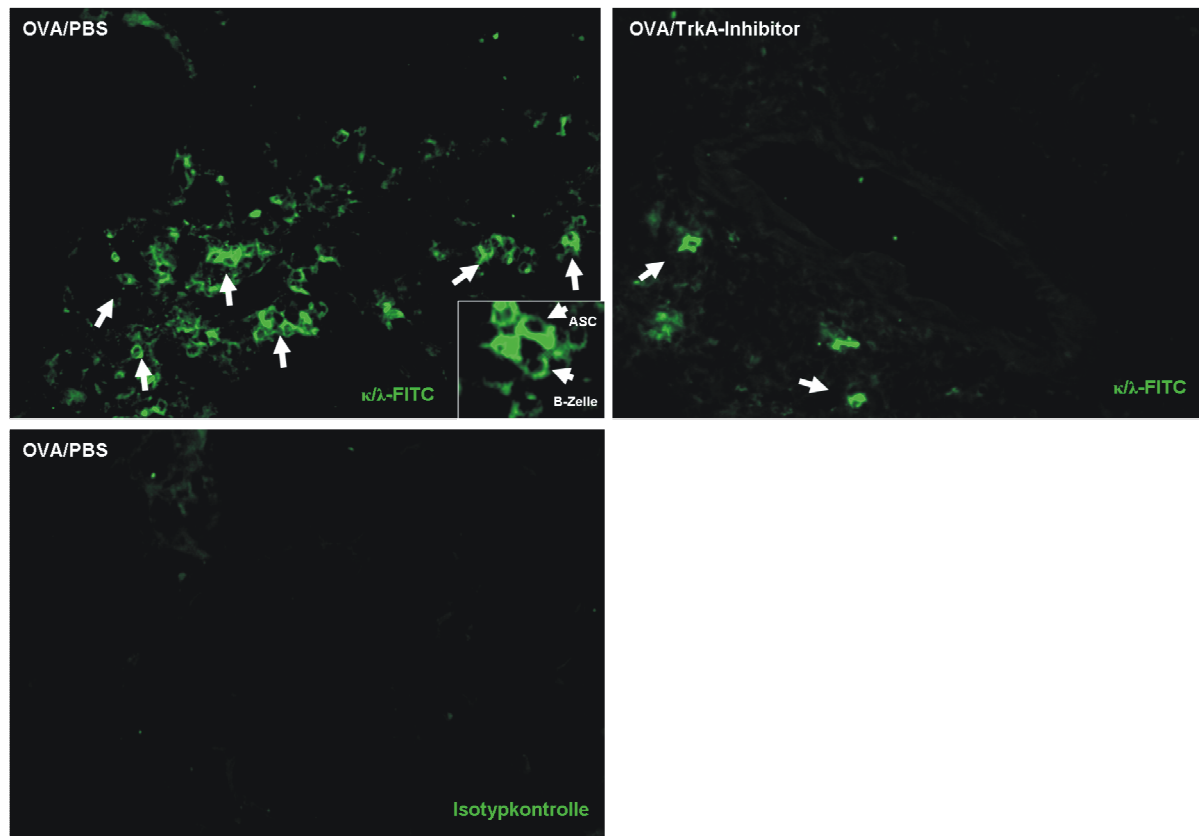


Abb.3.5.1b: Reduzierte Anzahl der pulmonaler ASCs nach TrkA-Inhibitor Gabe in allergischen Mäusen.

Dargestellt sind exemplarisch Ausschnitte ASC-spezifischer Färbungen der Lunge von TrkA-Inhibitor (OVA/TrkA-Inhibitor) behandelten Tieren, deren Kontrollgruppe (OVA/PBS) plus entsprechender Isotypkontrolle (OVA/PBS) sowie die statistische Auswertung aller Tiere (n=5). Die lokale Applikation des TrkA-Inhibitors führte zu einer signifikanten Reduktion der pulmonalen ASCs. OVA-Aerosol Inhalation (OVA) führte zu einer signifikanten Zunahme der ASC-Anzahl lokal in der Lunge im Vergleich zur OVA sensibilisierten Kontrollgruppe (Ko.). Die Anzahl der ASCs wird in ASC/Atemwegsquerschnitt angegeben. Die Experimente wurden zweimal unabhängig voneinander wiederholt. ** p<0.01; *** p<0.001

Im Vergleich zur Lunge, kam es zu keiner Veränderung der ASC-Anzahl in der Milz der TrkA-Inhibitor behandelten Tieren. Die PBS-behandelte Kontrollgruppe wies dabei mit durchschnittlich $38,43 \pm 3,85$ Zellen pro Gesichtsfeld, vergleichbar viele Zellen wie die TrkA-Inhibitor behandelten Tiere ($40,71 \pm 4,26$ Zellen pro Gesichtsfeld) auf. Die Anzahl der

OVA/Al(OH)₃ sensibilisierten Kontrollgruppe zeigte im Gegensatz zur Lunge eine erhöhte ASC-Anzahl (19,00±3,03 Zellen pro Gesichtsfeld) (siehe Abb. 3.5.1c)

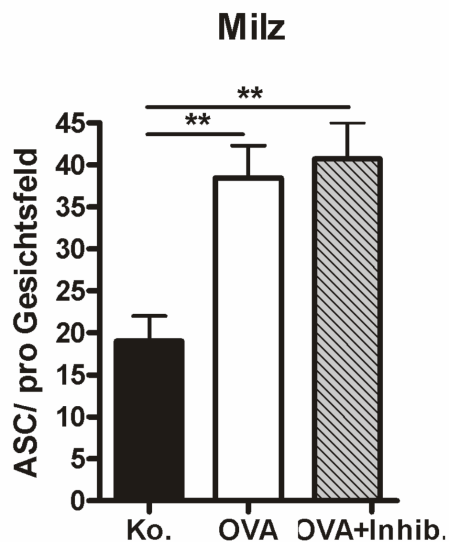
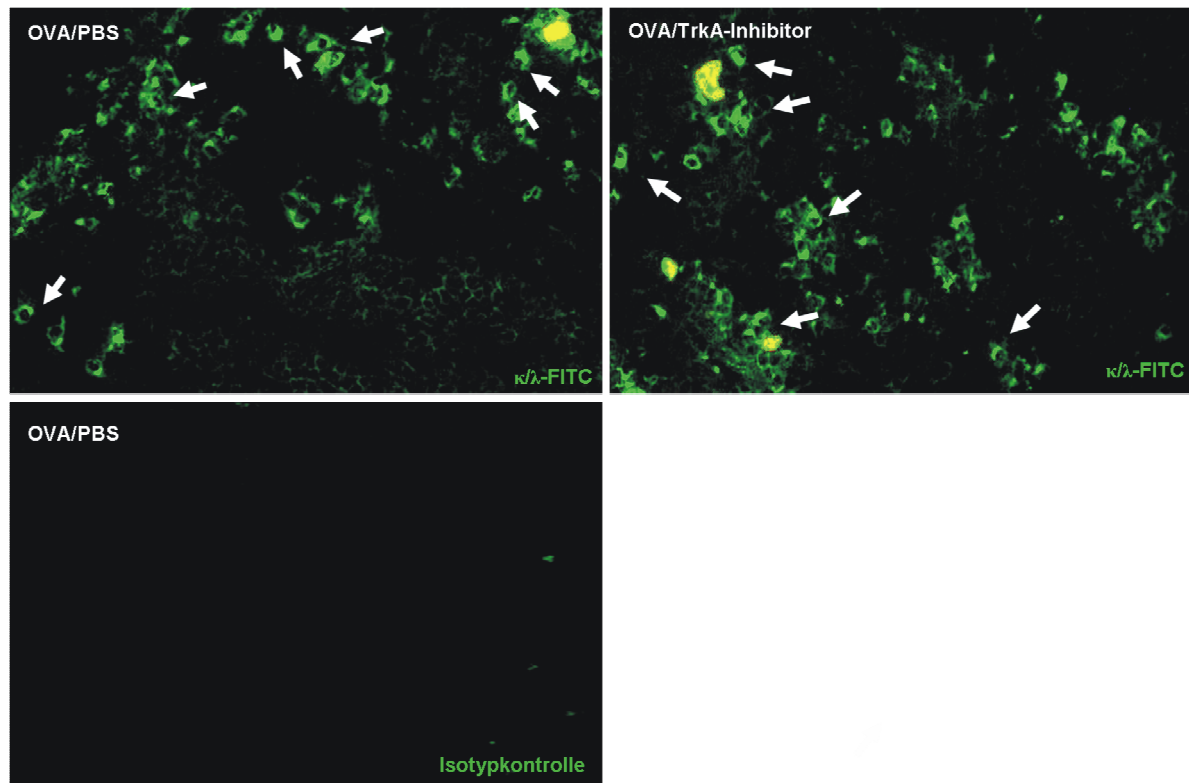


Abb.3.5.1c: Kontrollfärbungen der Milz in TrkA-Inhibitor behandelten Mäusen Dargestellt sind exemplarisch Ausschnitte ASC-spezifischer Färbungen der Milz von TrkA-Inhibitor (OVA/TrkA-Inhibitor) behandelten Tieren, deren Kontrollgruppe (OVA/PBS) plus entsprechender Isotypkontrolle (OVA/PBS) sowie die statistische Auswertung aller Tiere (n=5). Die lokale Applikation des TrkA-Inhibitors führte zu keinerlei Veränderungen in der lokalen ASC-Anzahl der Milz. OVA-Aerosol Inhalation (OVA bzw. OVA+Inhib.) führte zu einer signifikanten Zunahme der ASC-Anzahl in der Milz, verglichen zur OVA sensibilisierten Kontrollgruppe (Ko.) Die Anzahl der ASCs wird in ASC/Atemwegsquerschnitt angegeben. Die Experimente wurden zweimal unabhängig voneinander wiederholt. ** p<0.01

Wie in den bereits erwähnten Experimenten mit primären Plasmazellen nachgewiesen (siehe 3.2.), fördert die Zugabe von NGF das Überleben von pulmonalen Plasmazellen in der Kultur. Daher sollte in einem zusätzlichen Experiment der Einfluss einer lokal erhöhten NGF-

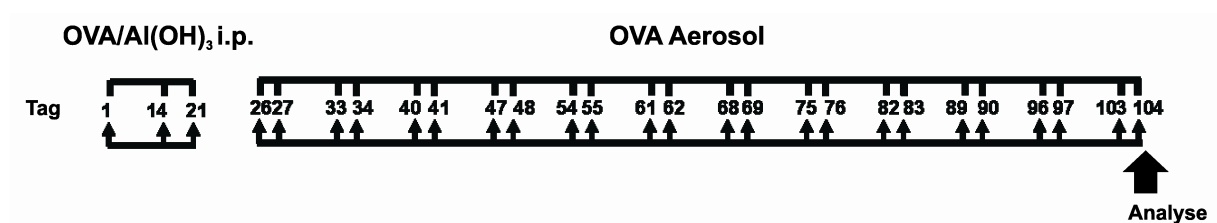
Expression in der Lunge auf die Anzahl pulmonaler Plasmazellen in der chronischen Atemwegsentzündung bestimmt werden. Dazu wurde der NGF-transgene Mausstamm verwendet. NGFtg-Mäuse zeichnen sich durch eine kontinuierliche Expression des Neurotrophins NGF in den Atemwegsepithelzellen aus. Nach erfolgter OVA-Sensibilisierung und Aerosolbehandlung ist in diesen Tieren eine stark erhöhte NGF-Konzentration durch gleichzeitige Produktion von NGF durch die Atemwegszellen aber auch der infiltrierenden Immunzellen, nachweisbar (Hoyle, Graham et al. 1998).

Es sollten in Lungengewebschnitten chronisch OVA-Aerosol-exponierter NGFtg- und Wildtypmäusen die Anzahl von Antikörper-sezernierenden Zellen bestimmt werden. Für die chronische Exposition wurden die Mäuse wie in 2.2.2 beschrieben mit OVA/Al(OH)₃ systemisch sensibilisiert und anschließend für 12 Wochen mit OVA-Aerosol behandelt (siehe Abb. 3.5.1d).

Nach diesen 12 Wochen wurden die Tiere getötet, und aus den Lungengeweben Kryopräparate angefertigt. Die anschließende Färbung und fluoreszenzmikroskopische Analyse der Gewebsschnitte mittels κ - bzw. λ -spezifischer Färbung ermöglichte die semiquantitative Bestimmung der ASC-Anzahl pro Atemwegsquerschnitt. Dabei wurden pro Schnitt jeweils 3 Atemwege bei 20facher Vergrößerung ausgezählt.

Es zeigte sich, dass die NGF transgenen Tiere ($29,83 \pm 4,46$ ASC/Atemwegsquerschnitt) eine doppelt so hohe ASC-Anzahl wie die zugehörige Wildtypkontrolle in der Lunge aufwiesen ($13,17 \pm 2,08$ ASC/Atemwegsquerschnitt; siehe Abb.3.5.1d). Auch eine vorherige Kontrollfärbung mit Anti-CD138-spezifischen Antikörpern zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl in den NGFtg Tieren ($37,33 \pm 4,17$ ASC/Atemwegsquerschnitt) gegenüber der Wildtypkontrolle ($16,00 \pm 3,46$ ASC/Atemwegsquerschnitt).

So konnte gezeigt werden, dass die lokale Produktion von NGF durch die Atemwegsepithelien zu einer erhöhten ASC-Anzahl auch nach 12 Wochen OVA-Aerosol Inhalation führte.



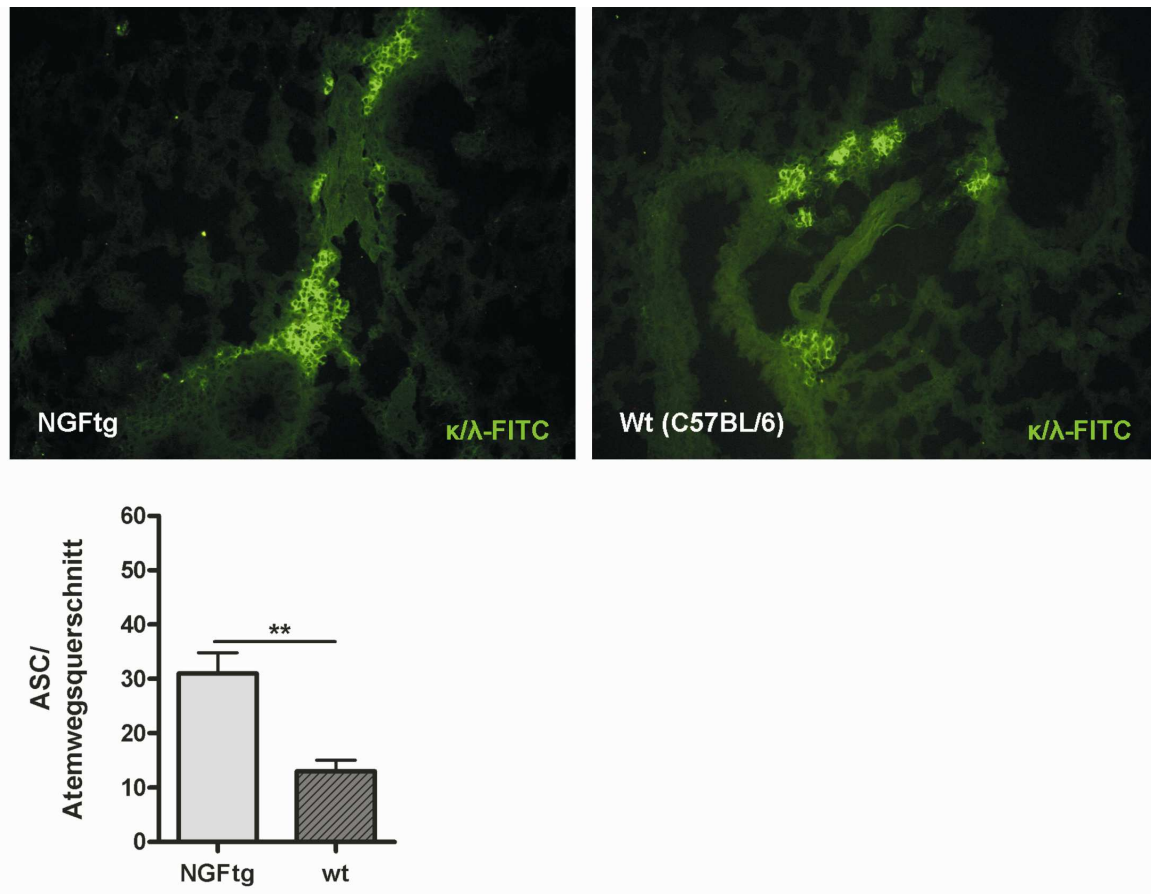


Abb. 3.5.1d: Erhöhte Anzahl von Antikörper-sezernierenden Zellen in der Lunge von NGFtg Mäusen. NGFtg und Wildtypiere (wt) wurden mit OVA/Al(OH)₃ sensibilisiert und anschließend für 12 Wochen mit OVA-Aerosol behandelt (a). Die Lungen der Tiere wurden präpariert, geschnitten und mit FITC-markierten Anti-κ bzw. λ Antikörpern direkt gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Anti-κ/ λ-Färbungen. NGFtg Tiere besitzen signifikant mehr ASCs als die dazugehörigen Wildtypiere (C57BL/6). Die Anzahl der ASC wird in ASC/Atemwegsquerschnitt angegeben. ** p<0.01

3.5.2. Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen im Serum TrkA-Inhibitor behandelter Mäuse

Um Aussagen über eine veränderte Immunglobulinproduktion nach lokaler Gabe des TrkA-Inhibitors zu treffen, wurde den Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten Blut entnommen (siehe Abb.3.5.2a) und hinsichtlich ihrer Immunglobulinkonzentration im Serum untersucht (siehe 2.2.4). Dabei wurden die Konzentrationen der OVA-spezifischen Immunglobuline der Isotypen IgE, IgG1 und IgG2a bestimmt (siehe 2.8.1). Außerdem sollte die Konzentration aller IgG1 und IgE Antikörper im Serum ermittelt werden.

Die Bestimmung der OVA-spezifischen IgE Konzentrationen im Serum am Tag 48 zeigte eine Reduktion in den TrkA-Inhibitor-behandelten Tieren (OVA+Inhib.) ($88,87 \pm 15,22$ ng/ml) auf 1/3 verglichen mit der OVA/PBS-behandelten Kontrollgruppe (OVA) ($259,1 \pm 41,97$ ng/ml). Die Konzentration der OVA-spezifischen IgG1 Antikörper der TrkA-Inhibitor-

behandelten Tiere (OVA+Inhib.) hingegen wies mit $10,29 \pm 2,48 \times 10^4$ ng/ml nur geringe Veränderungen gegenüber der OVA/PBS-behandelten Kontrollgruppe (OVA) auf ($13,02 \pm 2,60 \times 10^4$ ng/ml). Dies konnte ebenso für die OVA-IgG2a Immunglobuline beobachtet werden. Die OVA/PBS-Kontrollgruppe besaß dabei mit $4,39 \pm 1,65 \times 10^3$ ng/ml vergleichbar viele IgG2a Immunglobuline im Serum wie die TrkA-Inhibitor-behandelten Tiere ($3,59 \pm 0,65 \times 10^3$ ng/ml; siehe Abb. 3.5.2a). Allerdings konnte bereits in allen Tieren nach erfolgter systemischer Sensibilisierung mit OVA/Al(OH)₃ (Ko.) Konzentrationen von OVA-spezifischen IgE ($125,1 \pm 15,78$ ng/ml), IgG1 ($1,86 \pm 0,52 \times 10^4$ ng/ml) und IgG2a ($3,24 \pm 0,61 \times 10^3$ ng/ml) im Serum nachgewiesen werden. Im Fall der OVA-spezifischen IgE und IgG1 Immunglobuline war die Konzentration im Vergleich zur OVA/PBS Kontrollgruppe (OVA) aber deutlich reduziert. Die Titer der OVA-IgG2a Antikörper hingegen änderte sich nach OVA-Aerosol Inhalation plus zusätzlicher PBS Gabe nicht (siehe Abb. 3.5.2a schwarze Balken).

Die Änderung der OVA-spezifischen IgE Konzentration im Serum nach TrkA-Inhibitor Applikation (Tag 48) spiegelte sich ebenfalls in der IgE-Gesamtkonzentration wieder. Diese zeigte mit einer 1,5fachen Reduktion von $28,51 \pm 2,6 \times 10^3$ ng/ml in den OVA/PBS (OVA) Kontrolltieren auf $19,30 \pm 2,45 \times 10^3$ ng/ml in den TrkA-Inhibitor behandelten Tieren (siehe Abb. 3.5.2b) eine signifikante Änderung der Konzentration. Im Vergleich zu den OVA-spezifischen IgG1 Konzentrationen wiesen die IgG1-Gesamtkonzentrationen ebenfalls keine Veränderung auf. Die TrkA-Inhibitor-Gruppe (OVA+Inhib.) zeigte nur eine sehr leichte Abnahme der Konzentration im Serum ($2,12 \pm 0,46 \times 10^6$ ng/ml) im Vergleich zur OVA/PBS Kontrollgruppe (OVA) mit $3,14 \pm 0,28 \times 10^6$ ng/ml. Auch war in den OVA/Al(OH)₃-sensibilisierten Tieren (Ko.) an Tag 48 gesamt-IgE ($3,70 \pm 0,59 \times 10^3$ ng/ml) und -IgG1 ($1,11 \pm 0,27 \times 10^6$ ng/ml) nachzuweisen (siehe Abb. 3.5.2b schwarze Balken). Diese waren ebenfalls signifikant reduziert im Vergleich zu OVA-Aerosol behandelten Tieren (OVA).

Um zu kontrollieren, dass die reduzierten OVA-IgE bzw. Gesamt-IgE Konzentrationen nicht auf individuell veränderte Produktion durch die einzelnen Tiere beruhten, wurden allen OVA-Aerosol behandelten Tieren vor der TrkA-Applikation (Tag 46) Blut entnommen und die OVA-IgE bzw. -IgG1 Konzentrationen im Serum bestimmt. Die OVA-IgE ($228,5 \pm 23,07$ ng/ml)- bzw. IgG1 ($11,80 \pm 2,27 \times 10^4$ ng/ml) Konzentrationen aller Tiere unterschieden sich nicht in den Konzentrationen an (OVA; Tag 46) (siehe Abb. 3.5.2c). Die Bestimmung der OVA-IgE- und -IgG1-Konzentrationen an Tag 10 (Inhib. Tag 10) nach letztmaliger TrkA-Inhibitor-Applikation (Tag 57) zeigte zudem eine leichte Zunahme der beiden OVA-spezifischen Immunglobulinkonzentrationen (OVA-IgE: $127,40 \pm 16,13$ ng/ml; OVA-IgG1

$11,72 \pm 1,78 \times 10^6$ ng/ml) im Vergleich zu Tag 1/Tag 48 nach letztmaliger TrkA-Inhibitorgabe (Inhib. Tag 1, siehe oben; siehe Abb. 3.5.2c).

Insgesamt betrachtet konnte in den TrkA-Inhibitor behandelten Tieren eine signifikant reduzierte OVA-IgE bzw. Gesamt-IgE Konzentration im Serum bestimmt werden. Die Konzentrationen der Isotypen IgG1 und IgG2a hingegen wiesen keine Veränderung der Serumkonzentrationen auf. Im Vergleich zu Tag 1 nach TrkA-Inhibitorgabe konnte nach 10 Tagen ein leichter Anstieg der OVA-IgE und IgG1 spezifischen Immunglobuline verzeichnet werden.

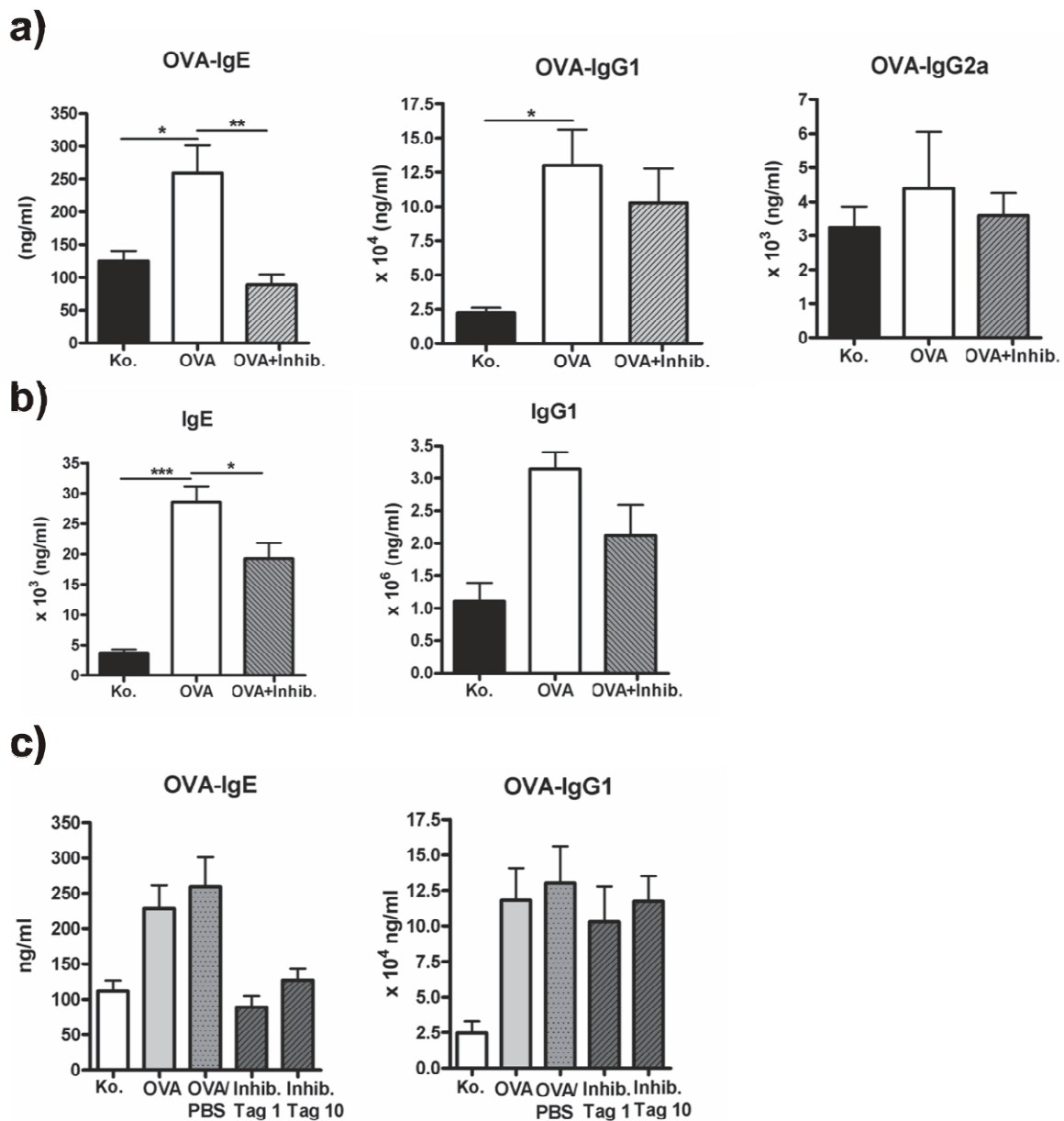


Abb. 3.5.2.: Konzentrationen von OVA-spezifischen und Gesamt-Immunglobulinen im Serum. Dargestellt sind die Konzentrationen der Immunglobuline in ng/ml. OVA-spezifischer IgE, IgG1 und IgG2a in OVA-sensibilisierten (Ko.), OVA-Aerosol+PBS/DMSO (OVA) bzw. TrkA-Inhibitor behandelten Tieren (OVA+Inhib.) an Tag 48 (a). Gesamt-IgE und -IgG1

Konzentrationen der OVA-sensibilisierten (Ko.), OVA-Aerosol+PBS/DMSO (OVA) bzw. TrkA-Inhibitor behandelten Tieren (OVA+Inhib.) an Tag 48 (b). OVA-IgE bzw. -IgG1 Konzentrationen von OVA systemisch sensibilisierten Tieren (Ko., Tag 48), OVA-Aerosol behandelten Tieren (OVA Tag; 46), OVA/PBS Kontrollgruppe (OVA/PBS; Tag 48), OVA-Aerosol+TrkA-Inhibitor behandelten Tieren 24 h nach letztmaliger Gabe (Inhib. Tag 1; Tag 48) sowie OVA-Aerosol+TrkA-Inhibitor behandelten Tieren 10 Tage nach letztmaliger Gabe (Inhib. Tag 10; Tag 57) (c). Die intranasale Verabreichung des TrkA-Inhibitor in OVA sens. + OVA-Aerosol behandelten Tieren führte zu einer signifikanten Abnahme der OVA-spezifischen IgE und gesamt-IgE Konzentration im Serum 24 h nach letztmaliger Applikation (a,b). Die Serumkonzentrationen der IgG1 bzw. IgG2a Isotypen veränderte sich nicht (a,b). 10 Tage nach letzter TrkA-Inhibitorgabe konnte eine leichte Zunahme der OVA-spezifischer IgE und -IgG1 Konzentrationen nachgewiesen werden (c). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3.5.3. Nachweis der Entzündungszellen in der Lunge und in der Broncho-Alveolären Lavage von TrkA-Inhibitor behandelten Mäusen

Nach der intranasalen Applikation des TrkA-Inhibitors konnte in den entsprechenden Tieren eine signifikante Abnahme der ASC-Anzahl um die Atemwege sowie die signifikante Reduktion der OVA- bzw. Gesamt -IgE-Konzentration im Serum nachgewiesen werden. Für die Bestimmung des Einflusses des TrkA-Rezeptors auf das allergische Entzündungsgeschehen, wurde in der Broncho-Alveolären Lavage (BAL) von TrkA-Inhibitor-behandelten und den OVA/PBS-Kontrolltieren (siehe 3.5.3a) die Anzahl von eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten bestimmt (siehe 2.2.5.). Zusätzlich wurde, wie in 2.9.2 beschrieben, mit Hilfe einer Hämatoxylin/Eosin (H&E)-Übersichtsfärbung ein Eindruck über Veränderungen des Entzündungsgeschehens in Lungengewebschnitten dieser Tiere gewonnen.

Wie Abb. 3.5.3a exemplarisch dargestellt, wiesen die HE-Färbungen der TrkA-Inhibitor behandelten Tiere (OVA+TrkA Inhib.), verglichen mit der PBS/DMSO Kontrollgruppe (OVA+PBS/DMSO), eine deutliche Reduktion des inflammatorischen Infiltrats um die Atemwege herum auf. In den systemisch OVA/Al(OH)₃ sensibilisierten Tieren (OVA sens.) konnten allerdings auch geringe Ansammlungen inflammatorischer Zellen detektiert werden, welche wohl aufgrund der induzierten systemischen Immunantwort gegen OVA entstanden sind.

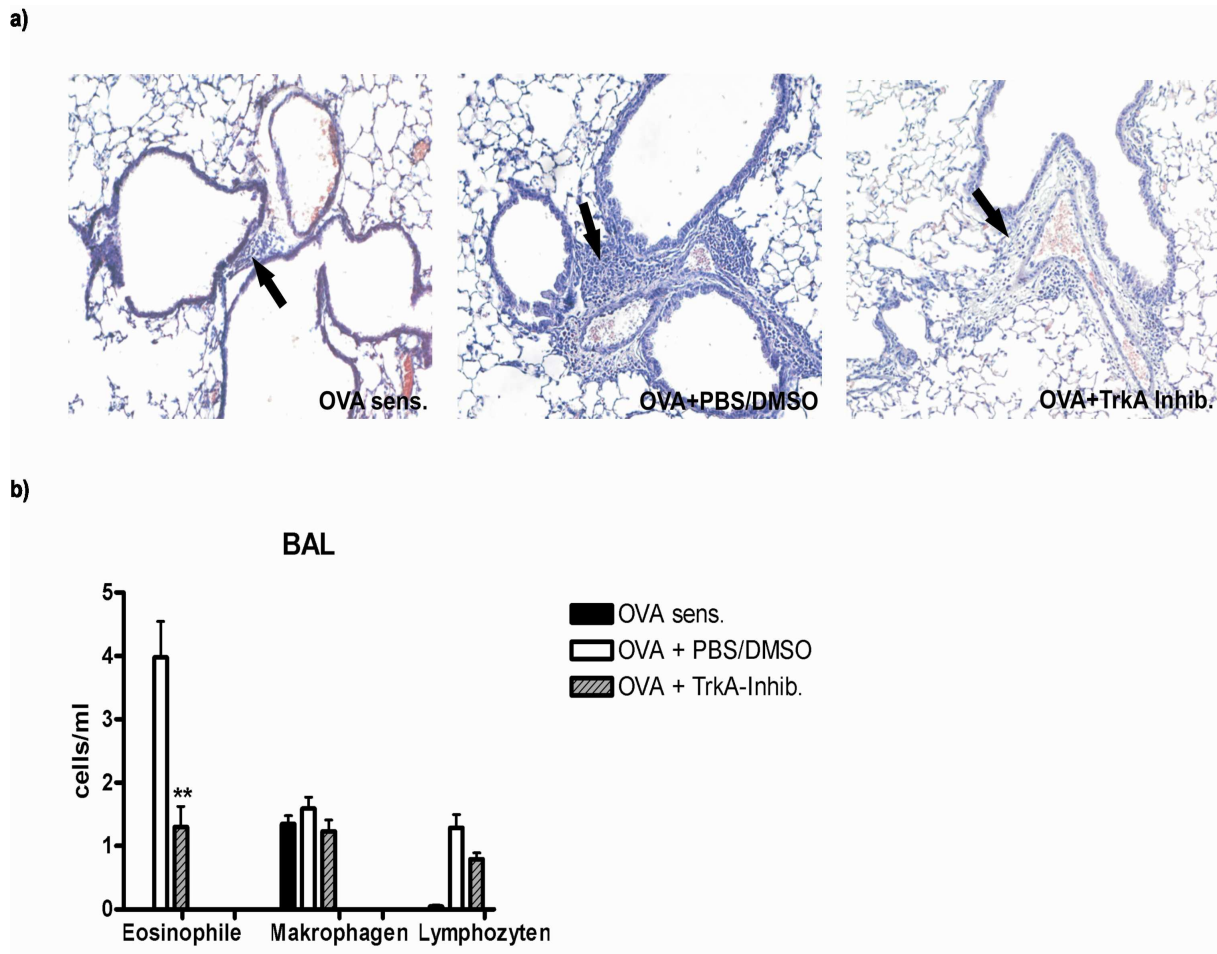


Abb.3.5.3: Reduktion des inflammatorischen Infiltrats nach lokaler Applikation des TrkA-Inhibitors. Dargestellt sind HE-Übersichtsfärbung (schwarze Pfeile) des Lungengewebes (10fach Vergrößerung) von TrkA-Inhibitor behandelten Tieren (OVA+TrkA Inhib.), Kontrolltieren (OVA+PBS/DMSO) und sens. Tieren (OVA sens.) (a). Die Charakterisierung und Quantifizierung der BAL-Zellpopulationen erfolgte mittels DiFFQuick-Färbung und lichtmikroskopischer Analyse. Die Blockierung des TrkA-Rezeptors in der Lunge führte zu einer signifikanten Reduktion der eosinophilen Granulozyten, sowie zur Reduktion der Lymphozyten in der BAL (b). Die Makrophagenanzahl blieb unverändert. In der OVA sens. Gruppe konnten keine eosinophilen Granulozyten und nur sehr geringe Zahlen von Lymphozyten detektiert werden. Auch hier blieb die Makrophagenanzahl im Vergleich zur OVA+PBS Kontrolle gleich. Die Anzahl wird in Zellen/ml angegeben. ** $p < 0.01$

Die beobachteten Veränderungen in den Übersichtsfärbungen konnten anschließend ebenfalls über eine Quantifizierung der Entzündungszellen in der BAL bestätigt werden. Dafür wurde die BAL der Tiere an Tag 48 entnommen und die Zellpopulationen mittels *DiffQuick*-Färbung morphologisch charakterisiert (siehe 2.2.5.). Die Anzahl der Zellen wurde in Zellen/ml angegeben. So zeigten die TrkA-Inhibitor behandelten Tiere (OVA+TrkA Inhib.) im Vergleich zu den PBS/DMSO behandelten Kontrolltieren (OVA+PBS/DMSO) eine signifikante Reduktion in der Anzahl der eosinophilen Granulozyten (OVA+PBS/DMSO: $3,78 \pm 0,61$ Zellen/ml; OVA+TrkA Inhib. $1,30 \pm 0,31$ Zellen/ml) sowie eine 1,5fache Abnahme der Lymphozytenanzahl (OVA+PBS/DMSO: $1,28 \pm 0,20$ Zellen/ml; OVA+TrkA Inhib. $0,79 \pm 0,09$ Zellen/ml) in der BAL (siehe Abb. 3.5.3b). Die Anzahl der Makrophagen aber

blieb in beiden Gruppen unverändert (OVA+TrkA Inhib.: $1,23 \pm 0,18$ Zellen/ml; OVA+PBS/DMSO: $1,58 \pm 0,18$ Zellen/ml). In den OVA/Al(OH)₃ sensibilisierten Tieren konnte eine vergleichbar hohe Anzahl an Makrophagen ($1,34 \pm 0,12$ Zellen/ml) verglichen mit den beiden anderen Gruppen bestimmt werden. Die Anzahl der Lymphozytenpopulation dieser Tiere war mit $0,04 \pm 0,02$ Zellen/ml vernachlässigbar klein. Eosinophile Granulozyten waren nicht detektierbar (siehe Abb. 3.5.3b).

Die lokale Blockierung des TrkA-Rezeptors mittels intranasaler Applikation eines spezifischen Inhibitors führte zusammengefasst zu einer drastischen Reduktion des inflammatorischen Infiltrats der Lunge, welche mit der signifikanten Reduktion der eosinophilen Granulozyten sowie der Reduktion der Lymphozytenanzahl in der BAL einherging.

3.5.4. Nachweis apoptotischer Zellen in der Lunge von TrkA-Inhibitor behandelten Mäusen

Zum Nachweis apoptotischer Zellen in der Lunge nach lokaler TrkA-Inhibitor Applikation (i.n.) wurde die *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) - Färbung verwendet. Dabei wurde wie in 2.9.3. beschrieben Paraformaldehyd-fixiertes Lungengewebe der Tiere in Paraffin eingebettet, in 6 µm dicke Schnitte geschnitten, und anschließend wieder entparaffiniert. Für die TUNEL-Färbung wurde das *In situ Cell Death Detection Kit* POD verwendet. Nach der TUNEL-Färbung erfolgte eine Gegenfärbung mit dem roten Farbstoff *Nuclear Fast Red*. Die durch zugegebene Peroxidasen und dem entsprechenden Substrat induzierte Enzymreaktion bewirkt in den TUNEL-positiven Zellen einen Farbumschlag nach Braun/Schwarz. Die TUNEL-negativen Zellen hingegen behalten ihre rote Färbung.

Die TUNEL-Färbung von Lungenschnitten TrkA-Inhibitor behandelte Tiere (OVA+TrkA) zeigte eine deutlich erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Zellen verglichen mit Lungenschnitten PBS/DMSO behandelte Kontrolltiere (OVA+PBS/DMSO). Eine Inkubation mit der Farblösung allein ohne entsprechende Enzyme (Neg. Kontrolle) bewirkte in OVA+PBS behandelte Tieren keinerlei TUNEL-spezifische Färbung. In Abbildung 3.5.4. sind exemplarisch TUNEL-Färbungen von Lungenschnitten TrkA-Inhibitor- und PBS/DMSO-behandelte Tiere, sowie von der Neg. Kontrolle abgebildet.

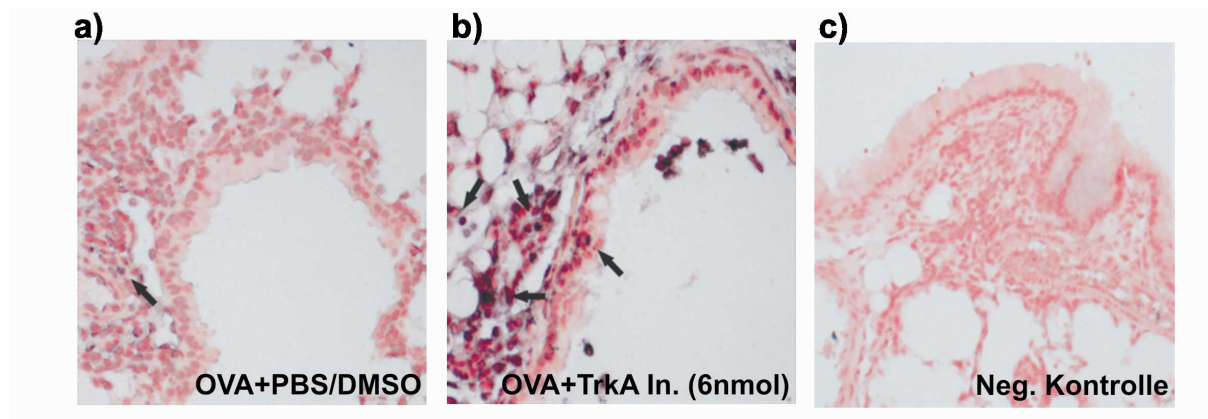


Abb. 3.5.4. TUNEL-spezifische Färbung in Gewebsschnitten der Lunge. Repräsentative Abbildungen der TUNEL-Färbung in Gewebsschnitten der Lunge von OVA+PBS/DMSO (a), OVA+TrkA-Inhibitor behandelten Tieren (b) und der Negativkontrolle (OVA+PBS/DMSO) (c). Die OVA+TrkA-Inhibitor behandelten Tieren wiesen eine deutlich erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Zellen (schwarze Pfeile) im Vergleich zur OVA+PBS/DMSO Kontrollgruppe.

4. Diskussion

Die zunehmende Bedeutung allergischer Erkrankungen führt zu einem erhöhten Interesse an der mechanistischen Regulation der IgE-Synthese. Die Produktion Allergen-spezifischer Antikörper durch Antikörper-sezernierende Plasmazellen nimmt innerhalb dieser Erkrankungen eine zentrale Rolle ein. Allergen-spezifisches IgE ist dabei essentiell an der Initiierung der allergischen Reaktion und der Entwicklung der allergischer Entzündungen beteiligt.

Eine kontinuierliche Produktion von Allergen-spezifischen Antikörpern im Bereich der Atemwege durch kontinuierlich präsente Plasmazellen könnte hier zu einer Persistenz der Entzündungsreaktion und der damit verbundenen Gewebsschädigungen beitragen. Das Überleben von Plasmazellen ist abhängig von exogenen Signalen aus dem umgebenden Mikromilieu des Entzündungsortes. Diese so genannten Überlebenssignale übermitteln der Plasmazelle, über die Bindung an deren spezifische Rezeptoren, Signale für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase. Inwiefern die lokale Präsenz von Plasmazellen in der Lunge reguliert wird, ist bisher völlig unklar. Ein für die allergische Atemwegsentzündung charakteristischer Marker ist das lokal gebildete Neurotrophin NGF. Dieses Protein wird in erhöhten Konzentrationen in der allergischen Atemwegsentzündung gebildet und spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation einer Vielzahl biologischer Prozessen. Ziel dieser Arbeit war, die Rolle von NGF im Überleben von lokalen pulmonalen Plasmazellen in der allergischen Atemwegsentzündung zu untersuchen.

4.1. Die Anwesenheit Allergen-spezifischer Plasmazellen in der Lunge ist entzündungsabhängig

Die Produktion und Sekretion von Antigen-spezifischen Antikörpern ist ein Alleinstellungsmerkmal von B-Zellen. Die Produktion hochaffiner Allergen-spezifischer IgE Antikörper spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen. Ihre Bindung an die hochaffinen FcεRI und FcεRII-Rezeptoren auf Mastzellen und anderen Entzündungszellen vermitteln die Induktion der allergischen Entzündungsreaktion. So zeigten therapeutische Studien mit dem monoklonalen Anti-IgE Antikörper Omalizumab eine deutliche Reduktion der Reaktion gegenüber Allergenen, der allergischen Atemwegsentzündung in erkrankten Personen (Avila 2007). Weiterhin zeigte sich, dass in der

Allergie und im Asthma die B- bzw. die Plasmazellpopulationen in der Mukosa des respiratorischen Trakts eine starke Ausrichtung hin zur Produktion von IgE-Antikörpern erfährt (Takhar, Corrigan et al. 2007). Dabei produzieren ungefähr 4 % der B-Zellen und 12-19 % der Plasmazellen in der nasalen Mukosa von Rhinitispatienten IgE-Antikörper. Im Vergleich dazu sind in gesunden Individuen lediglich 1 bzw. < 1 % IgE-produzierende B-Zellen bzw. Plasmazellen nachweisbar (KleinJan, Vinke et al. 2000). Des Weiteren ist die Konzentration von IgE im Serum gesunder Individuen 1000-mal geringer, verglichen mit der vorhandenen IgG-Konzentration. Die Anzahl der IgE-produzierenden Plasmazellen im Knochenmark ist dabei nur gering (Hibi and Dosch 1986). Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die Hauptquelle für die Produktion von IgE-Antikörpern lokal im betroffenen Gewebe, wie z.B. der nasalen Mukosa, zu finden ist. Diese Vermutung wird gestützt von der Beobachtung, dass generell die Allergen-spezifische IgE-Fraktion im Gewebe um die Hälfte höher ist als im Blut. (Smurthwaite, Walker et al. 2001) In Lungenbiopsien von Asthmapatienten konnte die Präsenz so genannter „switch circles“ und somit der lokale Klassenwechsel während der B-Zelldifferenzierung nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Mausmodells allergischer Erkrankungen konnte bisher eine lokale IgE-Produktion sowie eine Infiltration von B-Zellen in die Lunge allergischer Tiere gezeigt werden (Chvatchko, Kosco-Vilbois et al. 1996; Beier, Hutloff et al. 2004). Die Regulation dieser lokalen Allergen-spezifischen Antikörperproduktion ist aber bisher völlig unklar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, inwiefern die Anwesenheit und das Überleben bzw. die Antikörperproduktion vom lokalen allergischen Anetzündungsgeschehen abhängig ist.

Der in dieser Arbeit (siehe Abb. 3.1. und 3.1.1.) gezeigte deutliche Unterschied in der Anzahl Allergen-spezifischer Plasmazellen in der Lunge zwischen systemisch sensibilisierten Tieren und denen, welche zusätzlich das Allergen inhaliert haben, zeigt, dass die Bildung dieser Zellen von einer mukosalen Allergenprovokation abhängig ist. Die in der Folge der mukosalen Allergenprovokation induzierte allergische Atemwegsentszündung geht mit einer steigenden Präsenz Allergen-spezifischer Plasmazellen und $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen einher (siehe Abb.3.1.1.). Die Anzahl $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in systemisch sensibilisierten Tieren könnte auf eine Population von T-Gedächtniszellen hindeuten, die während der ersten, systemischen, Entzündungsreaktion durch die intraperitoneale Applikation des Allergens induziert wurde. Gedächtniszellen sind allgemein durch eine hohe Lebensdauer gekennzeichnet. Im Gegensatz zu Plasmazellen ist ihr Überleben nicht durch die Anpassung an eine Nische limitiert. Diese Abhängigkeit könnte auch die Abwesenheit von Allergen-

spezifischen Plasmazellen in der Lunge vier Wochen nach der systemischen Immunisierung erklären.

Des Weiteren ist der in der Abb. 3.1.1. gezeigte starke Unterschied im Plasmazellanteil zwischen Tag 1 und 2 der Kinetik ist vermutlich auf eine starke Infiltration bzw. die Entstehung von Allergen-spezifischen Plasmazellen in der Lunge zurückzuführen. Die erste OVA-Aerosol-Inhalation an Tag 49 (siehe Abb. 3.1a) führt bereits zu der Induktion der allergischen Atemwegsentzündung über die IgE-vermittelte Mastzelldegranulierung und zu einer dadurch hervorgerufene Infiltration von TH₂-Zellen (Gould and Sutton 2008). Gleichzeitig zu der Infiltration der TH₂-Zellen könnte es zu einer starken Infiltration von Plasmablasten sowie zu der Aktivierung von B-Zellen lokal in der Entzündungsreaktion kommen. Anschließend beginnen die infiltrierte bzw. entstandenen Plasmablasten innerhalb von 3 Tagen mit ihrer Reifung zu Plasmazellen. Dies ist u.a. gekennzeichnet durch die verstärkte Expression von Syndecan-1 (CD138) und dem Verlust des B-Zellrezeptors (B220) auf ihrer Oberfläche (Manz, Lohning et al. 1998). Hervorgerufen durch die zweite OVA-Aerosol-Provokation (nach 3 Tagen; siehe Abb. 3.1.) kommt es erneut zur Plasmazellbildung bzw. Einwanderung, verbunden mit der Reifung, in der Lunge innerhalb von wenigen Stunden. Diese zweite „Welle“ Allergen-spezifischer Plasmablasten könnte somit zu einer Überlagerung der bereits residenten Plasmazellen und somit zu einem verstärkten Fluoreszenzsignal führen. Es ist anzunehmen, dass während des Differenzierungsprozesses ein großer Teil der gebildeten Plasmazellen durch Induktion der Apoptose stirbt. Weiterhin könnte die Anzahl an geeigneten Nischen innerhalb der lokalen Entzündungsreaktion begrenzt sein, so dass durch die Verdrängung residenter Plasmazellen durch die „zweite Welle“, verbunden mit der Apoptose ungeeigneter Zellen, eine Reduktion des Plasmazellanteils induziert wird. Das anschließend erreichte Plateau des Plasmazellanteils sowie die stetige Zunahme der CD138- und OVA-spezifischen Fluoreszenz der Zellen könnten auf eine vollständige Reifung der verbliebenen Allergen-spezifischen Plasmazellen hindeuten.

Auffällig ist jedoch, dass im weiteren Verlauf, der hier durchgeführten Kinetik, an den Tagen 10 und 20, ohne weitere mukosale Allergenprovoaktion der Anteil der Allergen-spezifischen Plasmazellpopulation sowie der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen drastisch abnimmt (siehe Abb. 3.1.1). Diese Reduktion ist auf die Abhängigkeit der Aufrechterhaltung des allergischen Entzündungsprozesses durch kontinuierliche Allergengabe zurückzuführen. In früheren Studien konnte beobachtet werden, dass ohne kontinuierliche Allergenprovokation (ab Tag 11), zu einer starken Reduktion des gesamten Entzündungsprozesses kommt (Epstein 2004).

Diese Normalisierung der allergischen Entzündungsreaktion geht dabei ebenso mit der Reduktion essentieller Signale einher. Da das Überleben von Plasmazellen lokal in entzündetem Gewebe nur durch die Aufrechterhaltung des Entzündungsmilieus gewährleistet wird, könnte die Reduktion der allergischen Atemwegsentszündung in der Maus zu einem Rückgang der Plasmazellpopulation durch das Fehlen des spezifischen Mikromilieus führen. So konnten wir in ersten weiterführenden Versuchen für die Aufrechterhaltung der allergischen Atemwegsentszündung mit Hilfe der chemischen Noxe NO₂ (Wegmann, Fehrenbach et al. 2005), eine signifikant höhere Allergen-spezifische Plasmazellpopulation während der künstlich verlängerten Entzündungsreaktion erreicht werden. Dabei wird die bereits bestehende allergische Entzündungsreaktion, ohne dass weitere Gaben des Allergens OVA nötig wären, chronifiziert. Die detektierte Allergen-spezifische Plasmazellpopulation überlebt somit unabhängig von ihrem Antigen durch die Anpassung an das persistierende Entzündungsmilieu. Das Antigen-unabhängige Überleben ist ein Charakteristikum langlebiger Plasmazellen. Es ist anzunehmen, dass bei einer chronischen Entzündung der Atemwege ein konstantes Überleben der hier beobachteten pulmonalen Plasmazellen gewährleistet wird. Auch die Herkunft lokaler pulmonaler Plasmazellen ist eine ungeklärte Frage bei der allergischen Erkrankung. Es gibt sowohl Hinweise für die lokale Bildung von Plasmazellen durch Bildung von Keimzentrumsreaktionen (Chvatchko, Kosco-Vilbois et al. 1996), als auch für die Infiltration von B-Zellen aus sekundären Lymphorganen nach Allergenkontakt. Beide Hypothesen haben sicherlich ihre Berechtigung, da die Migration bzw. die lokale Entstehung und Reifung von Plasmablasten zu Plasmazellen bei anderen Erkrankungen, z.B. Autoimmunerkrankungen, beobachtet wurden.

Da der in dieser Arbeit beobachtete Anteil Allergen-spezifischer Plasmazellpopulationen in der Lunge von mukosal Allergen-provozierten Mäusen bei einer Reduktion der Entzündungsreaktion durch Ausetzen der Allergengabe ebenfalls signifikant abnimmt, wird vermutet, dass die Anwesenheit dieser Zellen abhängig sein muss vom entzündlichen Mikromilieu.

4.2. NGF vermittelt das Überleben pulmonaler Plasmazellen in der allergischen Atemwegsentzündung

4.2.1. Plasmazellen der Lunge, der Milz und des Knochenmarks zeigen unterschiedliche Expressionsmuster von Trk-Rezeptoren

In dieser Arbeit konnte erstmals die Anpassung von Plasmazellen unterschiedlicher Herkunft an das umgebende Milieu nachgewiesen werden. So herrscht in der allergischen Atemwegsentzündung ein TH₂-Zell-dominiertes Mikromilieu vor (Barnes 2008), in dessen Verlauf zahlreiche Faktoren als essentiell für die Entstehung sowie die Progression des Entzündungsprozesses identifiziert werden konnten. Charakteristische Marker dieses Prozesses sind dabei Vertreter der Familie der Neurotrophine. Zu ihnen gehören u.a. die Neurotrophine NGF, BDNF, NT3 sowie NT4/5. Sie stehen im Verdacht, maßgeblich an der Regulation der allergischen Reaktion der Lunge beteiligt zu sein. So konnten sie in erhöhter Konzentration im broncho-alveolären Fluid von Asthmapatienten nach einer segmentalen Allergenprovokation nachgewiesen werden (Virchow, Julius et al. 1998). Auch die Schwere des Krankheitsbildes sowie der IgE-Spiegel korreliert mit der Serumkonzentration von NGF in den Patienten (Bonini, Lambiase et al. 1996). Diese Beobachtungen konnten auch im Mausmodell des allergischen Asthmas bestätigt werden. So war es möglich ebenfalls möglich in der BAL von Allergen-behandelten Tieren stark erhöhte NGF und BDNF-Spiegel zu detektieren (Braun, Appel et al. 1998; Rochlitzer, Nassenstein et al. 2006). Als zelluläre Quelle für Neurotrophine kommen sowohl Struktur- als auch Immunzellen in Betracht. Das Atemwegsepithel, das als Barriere zwischen dem Atemwegslumen und dem unterliegenden Gewebe fungiert, zeigt eine konstitutive Expression von NGF, BDNF und NT3 (Lommatzsch, Braun et al. 1999; Fox, Patel et al. 2001). Es konnte dabei eine erhöhte BDNF-Produktion in Folge der allergischen Atemwegsentzündung beobachtet werden (Ricci, Felici et al. 2004). Als eine weitere wichtige Quelle für die Neurotrophinproduktion konnten pulmonale Fibroblastenzellen identifiziert werden. Dabei kann deren Neurotrophinproduktion durch die inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β positiv beeinflusst werden (Fox, Patel et al. 2001; Olgart and Frossard 2001). Auch weitere Strukturzellen, wie die glatten Muskelzellen der Lunge gelten als Neurotrophinproduzenten (Ricci, Felici et al. 2004).

Eine weitaus bedeutendere Gruppe von Neurotrophinproduzenten stellen allerdings die Immunzellen dar. Sie sind nicht nur in der Lage, auf Neurotrophinsignale zu reagieren,

sondern sind gleichzeitig selber deren Produzenten. Bekannt ist etwa die Produktion von NGF, BDNF und NT3 durch die entzündungsinduzierenden Mastzellen; die Quervernetzung des gebundenen IgEs auf ihrer Oberfläche u.a. auch zur Sekretion von NGF (Leon, Buriani et al. 1994; Tam, Tsai et al. 1997; Xiang and Nilsson 2000). Den Hauptanteil der Entzündungszellen im inflammatorischen Infiltrat der Lunge stellen jedoch die eosinophilen Granulozyten. Auch diese konnten bereits zusammen mit den interstitiellen und alveolaren Makrophagen als eine Quelle für NGF, BDNF und NT3 innerhalb der allergischen Atemwegsentzündung bestimmt werden (Solomon, Aloe et al. 1998; Ricci, Greco et al. 2001; Hikawa, Kobayashi et al. 2002; Kobayashi, Gleich et al. 2002; Schulte-Herbruggen, Nassenstein et al. 2005). Ebenso sind lokale Lymphozyten der allergischen Atemwegsentzündung in der Lage, Neurotrophine zu produzieren. In verschiedenen Studien wird dabei die Produktion von NGF entweder durch $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen (Santambrogio, Benedetti et al. 1994), aber auch durch beide Populationen berichtet (Lambiase, Bracci-Laudiero et al. 1997). B-Zellen wurden ebenfalls früh als eine Quelle für NGF, BDNF und NT3 nach einer Antigen-Stimulierung bestimmt (Santambrogio, Benedetti et al. 1994; Torcia, Bracci-Laudiero et al. 1996; Kerschensteiner, Gallmeier et al. 1999; Edling, Nanavati et al. 2004). Die Produktion von Neurotrophinen durch Antikörper-sezernierende Zellen wurde bisher aber nicht beschrieben.

Durch den Allergenkontakt ausgelöste massive Infiltration von Immunzellen, zusammen mit der Aktivierung der lokalen Strukturzellen, wird somit innerhalb der allergischen Atemwegsentzündung ein vielfältiges Neurotrophinmilieu ausgebildet. Für lokale Plasmazellen der allergischen Atemwegsentzündung könnte das stark ausgeprägte Neurotrophinmilieu ein wichtiger Bestandteil einer bisher nicht charakterisierten Überlebensnische in der infiltrierten Lunge darstellen.

Da in Abschnitt 2.4.3 beschrieben, die Identifizierung bzw. Sortierung von Isotyp- und Allergen-spezifischen Plasmazellen eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen voraussetzt, wurden in dieser Arbeit allgemein reife, d.h. nicht mehr proliferationsaktive, Plasmazellen unabhängig ihres Isotyps oder ihrer Spezifität hinsichtlich ihres Überlebens untersucht.

Wie in Abb. 3.2.1 dargestellt, konnte innerhalb dieser Arbeit die Fragestellung einer jeweiligen Adaption der Plasmazellen an das vorherrschende Mikromilieu erstmals beantwortet werden. So weisen die isolierten Plasmazellen der Lunge, der Milz und des Knochenmarks hinsichtlich der Ausprägung von Neurotrophin-Rezeptoren ein deutlich differenziertes Expressionsmuster je nach ihrer Herkunft auf. So zeigen pulmonale

Plasmazellen ein deutliches Signal für die TrkA-Rezeptorexpression auf transkriptioneller wie translationaler Ebene. Diese TrkA spezifischen Signale konnten dabei weder in Plasmazellen der Milz sowie des Knochenmarkes detektiert werden. Auch konnten hinsichtlich einer TrkC- und TrkB- Expression Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen festgestellt werden. Plasmazellen der Lunge sowie der Milz exprimieren den TrkC- aber nicht den TrkB-Rezeptor (siehe Abb. 3.2.1a). Eine weitere Besonderheit ist das völlige Fehlen von Trk-Rezeptoren in Plasmazellen des Knochenmarkes (siehe Abb. 3.2.1c). Im Milieu des Knochenmarks scheinen Neurotrophine daher keine essentiellen Faktoren für die Persistenz dieser Zellen darzustellen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Identifizierung von Überlebensfaktoren für isolierte Plasmazellen des Knochenmarks *in vitro*. So konnten in früheren Studien u.a. das Interleukin-6 sowie Hyaluronsäure als hochpotente Überlebensfaktoren für diese Population bestimmt werden (Cassese, Arce et al. 2003). Diese Faktoren werden beide auch *in vivo* lokal gebildet, wobei die Bedeutung von IL-6 auf die Plasmazellpopulation *in vivo* begrenzt zu sein scheint (Cassese, Arce et al. 2003; Allen, Ansel et al. 2004). In neuesten Studien wird aber generell die Bedeutung von gewebsspezifischen Faktoren bei der Vermittlung von Überlebenssignalen im Knochenmark verdeutlicht (Minges Wols, Ippolito et al. 2007; Chevrier, Genton et al. 2009). Über die Beschaffenheit von Überlebensnischen in der Milz von gesunden wie allergischen Individuen ist bisher in der Maus sowie im Menschen nichts bekannt.

Untersuchungen hinsichtlich des Neurotrophin-vermittelten Überlebens von Entzündungszellen im allergischen Asthma zeigten bisher speziell die Bedeutung von NGF auf die Population eosinophiler Granulozyten in der Lunge allergischer Mäuse (Hahn, Islamian et al. 2006). Dieses konnte auch für die eosinophile Granulozyten in der menschlichen Lunge mittels Kulturexperimenten bestätigt werden (Nassenstein, Braun et al. 2003).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der isolierten pulmonalen Plasmazellen der Lunge und der Milz ergab auch ein differenziertes Bild einer Neurotrophinexpression. Es konnte dabei, wie in Abb. 3.2.b dargestellt, erstmal gezeigt werden, dass Antikörper-sezernierende Zellen ebenfalls Neurotrophine auf transkriptionaler Ebene exprimieren. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied der pulmonalen Expressionsmuster verglichen mit der Milz. Pulmonale Plasmazellen exprimieren keine NGF-spezifische mRNA. Sie exprimieren dagegen mRNA für NT3 und BDNF. Die Plasmazellen der Milz hingegen zeigen ein deutliches NGF-spezifisches Signal. Aufgrund der geringen Anzahl der Zellen und den damit verbundenen schwachen Signalen ist eine Quantifizierung gebildeter Neurotrophine auf Proteinebene mit den heutigen Methoden leider nicht möglich. Eine Neurotrophinexpression

durch Plasmazellen könnte auf eine regulatorische Rolle dieser Zellen innerhalb des Entzündungsgeschehens hindeuten. Bisher werden Plasmazellen lediglich als Endprodukte der B-Zelldifferenzierung und somit als Antikörperproduzenten angesehen. Eine mögliche entzündungsmodulierende Funktion über die Produktion von BDNF und NT3 stellt daher einen sehr interessanten Aspekt dar. Insgesamt gesehen deutet die in dieser Arbeit nachgewiesene unterschiedliche Ausprägung der Trk-Rezeptoren, mit der exklusiven TrkA-Rezeptorexpression in pulmonalen Plasmazellen, auf eine Adaption der Plasmazellpopulationen an das jeweilige Neurotrophinmilieu hin. Die fehlende Proliferationsaktivität, verbunden mit der schwachen Ausprägung von MHC II und B220 auf ihrer Oberfläche, weist sie als reife Plasmazellen aus, die ihre Differenzierung bereits vollendet haben. Eine interessante Fragestellung wäre somit, ob die pulmonalen Plasmazellen eine komplett eigene Population innerhalb der Plasmazellen darstellen (das würde bedeuten, dass Plasmazellen, die den TrkA-Rezeptor exprimieren, immer lokal in der Lunge präsent sind), oder ob Plasmablasten/-zellen, die in die Lunge wandern, in Folge des Milieus immer den TrkA-Rezeptor exprimieren. Inwiefern Plasmazellen unterschiedlicher Lebensdauer oder unterschiedlicher Herkunft distinkte Populationen darstellen, ist noch unklar.

4.2.2. NGF und NT3 vermitteln das Überleben von pulmonalen Plasmazellen *in vitro*

Das Überleben von Plasmazellen ist von so genannten Überlebensnischen abhängig, die durch verschiedene lokalspezifische Faktoren gebildet werden. Inwiefern die allergische Atemwegsentzündung bzw. die Atemwegsmukosa solche Überlebensnischen für Plasmazellen ausbilden und welche Faktoren daran beteiligt sind ist bisher völlig unbekannt. Die Familie der Neurotrophine repräsentiert eine Gruppe von hochpotenten Mediatoren der Entwicklung, Differenzierung und des Überlebens von neuronalen und Immunzellen. Innerhalb dieser Arbeit konnte so erstmals eine entsprechende Vermittlung des Überlebens pulmonaler Plasmazellen nachgewiesen werden. In früheren Studien konnte insbesondere die regulatorische Rolle von NGF auf Immunzellen der allergischen Atemwegsentzündung sowie dem Entzündungsprozess selbst nachgewiesen werden. So zeigte sich, dass NGF in der Aktivierung und beim Überleben von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten in der Atemwegsmukosa beteiligt ist (Freund-Michel and Frossard 2008). Innerhalb der Lymphozytenpopulation ist die Wirkung von NGF bisher nur marginal charakterisiert. So zeigten erste Untersuchungen, dass sowohl T- als auch B-Zellen den NGF-spezifischen TrkA-

Rezeptor exprimieren. Dabei existiert allerdings ein Unterschied in der Liganden- und Rezeptorexpression innerhalb der T-Zellsubpopulationen. So stellen TH₁ und TH₂-Zellen zelluläre Quellen für NGF dar, aber nur TH₂-Zellen exprimieren gleichzeitig auch den TrkA-Rezeptor auf ihrer Oberfläche (Ehrhard, Erb et al. 1994; Lambiase, Bracci-Laudiero et al. 1997). NGF-Gabe stimuliert nicht nur die Proliferation und Differenzierung von TH₂-Zellen, sondern stimuliert über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *c-fos* sowohl die Produktion von IL-4 und IL-10 in T-Zellen als auch die Produktion von CGRP in B-Zellen (Ehrhard, Erb et al. 1994; Bracci-Laudiero, Aloe et al. 2002; Bayas, Kruse et al. 2003). Eine verstärkte IL-4-Produktion könnte so zusätzlich zur Modulierung der Immunglobulinsynthese innerhalb der Entzündungsreaktion beitragen.

Die Wirkung von NGF auf B-Zellen ist weit weniger charakterisiert. Es konnten in Arbeiten die Expression von TrkA und p75 auf B-Zellen (Torcia, Bracci-Laudiero et al. 1996) sowie eine positive Wirkung von NGF auf die Differenzierung, Proliferation und Immunglobulinproduktion gezeigt werden (Otten, Ehrhard et al. 1989; Kimata, Yoshida et al. 1991; Otten, Scully et al. 1994; Bracci-Laudiero, Aloe et al. 2002). NGF verstärkt aber nicht nur die frühen Aktivierungsmechanismen, sondern ist auch an der Vermittlung des Überlebens von B-Gedächtniszellen beteiligt. Dabei stimuliert NGF die Aktivierung der MAPK p38 und des anti-apoptotischen Proteins Bcl2, und vermittelt das Überleben dieser „ruhenden“ Zellen (Torcia, Bracci-Laudiero et al. 1996; Torcia, De Chiara et al. 2001; Rosini, De Chiara et al. 2004). Diese Arbeiten wurden allerdings mit Hilfe von immortalisierten Zelllinien durchgeführt, die wesentliche Unterschiede in ihren zellbiologischen Eigenschaften verglichen mit primären Zellen besitzen, und somit nicht zwangsläufig direkt übertragbare Erkenntnisse liefern. *In vivo* Studien konnten dagegen eindeutig die Beteiligung von NGF an der Entwicklung und Persistenz der allergischen Atemwegsentszündung belegen. Bei NGF-transgenen Mäusen, welche NGF in der Lunge verstärkt konstitutiv exprimiert, konnte eine signifikante Zunahme der Lymphozyten- sowie der Makrophagenanzahl in der BAL der Tiere beobachtet werden (Quarcoo, Schulte-Herbruggen et al. 2004).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Überlebensstudien mit primären pulmonalen Plasmazellen und NGF- bzw. NT3-Gabe beantwortet erste Fragen hinsichtlich der Regulation der Langzeit-Immunglobulinsynthese in der allergischen Atemwegsentszündung, unabhängig von aktivierten bzw. differenzierenden lokalen B-Zellen. Das in Abb. 3.2.2d dargestellte Überleben reifer pulmonaler Plasmazellen verdeutlicht ebenfalls die essentielle Rolle gewebsspezifischer Faktoren in der Regulation der Plasmazellhomöostase. Durch die Isolierung und Kultivierung von reifen Plasmazellen sollte gewährleistet werden, dass die

Gabe von NGF und NT3 zur Kultur nicht zu einer verstärkten Proliferation führt, sondern zu einem verstärkten Überleben proliferationsinaktiver Zellen. So konnte im Rahmen dieser das Fehlen der Proliferationsaktivität dieser Zellen über die Bestimmung des Einbaus des Thymidinanalogon BrdU nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.2.2b/c). Der Oberflächenphänotyp, zusammen mit der Abwesenheit proliferativer Eigenschaften, charakterisieren die Zellen als ausdifferenzierte Plasmazellen, die so an der Aufrechterhaltung einer Langzeitimmunglobulinproduktion lokal in der Atemwegsmukosa beteiligt sein könnten. Die hier beobachtete signifikant erhöhte Zunahme der Anzahl lebender Zellen nach Gabe aufsteigender Konzentrationen NGF oder NT3 im Vergleich zu unstimulierten Kontrollkulturen weist auf die Beteiligung dieser beiden Faktoren an einer Überlebensnische in der allergischen Atemwegsentzündung hin.

Im Fall von NGF scheint die Vermittlung von Überlebenssignalen in einer dosisabhängigen Form stattzufinden. Die Gabe höherer Konzentrationen NT3 führte dagegen zu keinem weiteren Anstieg überlebender Zellen. Dies könnte an der gleichzeitigen Produktion von NT3 durch die Plasmazelle selbst liegen. In bereits oben erwähnten *in vitro* Studien konnte für NGF und TrkA ein autokriner Effekt auf B-Zellen vermutet werden. Ein NT3-spezifischer autokriner Mechanismus könnte so auch die frühzeitige Sättigung des beobachteten Effekts verursachen, wobei keine weitere Steigung der Überlebensrate erreicht werden kann. Auch eine gleichzeitige Gabe geringer Konzentrationen beider Neurotrophine in Vorversuchen führte zu keinem weiteren großen Anstieg überlebender pulmonaler Plasmazellen. Diese Erkenntnisse deuten auf eine hohe Potenz dieser Faktoren hin, auch bei niedrigen Konzentrationen einen starken Effekt auf die Plasmazellhomöostase zu haben.

Durch die hier nachfolgend durchgeführte Inhibition des TrkA-Rezeptors auf kultivierten Plasmazellen, konnte ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der NGF/TrkA-Interaktion für die Übermittlung von Überlebenssignalen erbracht werden (siehe Abb. 3.2.3.). Durch die Gabe eines hochselektiven TrkA-Inhibitors bzw. durch die Gabe eines neutralisierenden Anti-NGF-Antikörpers zu den Plasmazellkulturen konnte, trotz der Präsenz von NGF im Kulturmedium, eine signifikante Abnahme der lebenden Plasmazellen beobachtet werden. Diese Reduktion ist mit der Induktion von Apoptose assoziiert (siehe Abb. 3.2.3c). Der TrkA-Inhibitor blockiert selektiv die ATP-Bindetasche des Rezeptors, was, trotz NGF-Bindung, zu einer Inhibierung des NGF-spezifischen Signalwegs führt. Die Reduktion verdeutlicht nicht nur die Abhängigkeit des Überlebens pulmonaler Plasmazellen von dem NGF-spezifischen Signalweg, sondern schließt gleichzeitig eine eventuellen Beteiligung des niedrigaffinen p75-Rezeptors auf die Vermittlung des Überlebens pulmonaler Plasmazellen aus. Der p75-

Rezeptor weist eine erhöhte Affinität gegenüber Pro-NGF (Chao 2003), aber eine verringerte Affinität gegenüber maturem NGF auf. Die Aktivierung des Rezeptors durch die bevorzugte Bindung von Pro-Neurotrophinen führt zur Induktion von Apoptose, im Gegensatz zum TrkA-Rezeptor, dessen Aktivierung durch die hochaffine Bindung von maturem NGF zur Übermittlung von Überlebenssignalen führt (Levi-Montalcini, Dal Toso et al. 1995; Frossard, Freund et al. 2004). Plasmazellen des Knochenmarks hingegen, welche hier unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden, zeigen eine unveränderte Zellhomöostase (siehe Abb. 3.2.3b), was den spezifischen Effekt der beiden Neurotrophine sowie deren Rezeptoren in der Regulation der lokalen Antikörperproduktion innerhalb der allergischen Atemwegsentzündung verdeutlicht. Inwiefern die Übermittlung von Überlebenssignalen durch die Aktivierung des TrkC-Rezeptors gesteuert wird, konnte durch Inhibierungsstudien nicht erörtert werden, da für diesen entsprechende Inhibitoren nicht bekannt sind. In früheren Studien ist die Bindung von NT3 an den TrkA-Rezeptor mit niedriger Affinität beschrieben worden (Chao 2003). Dies könnte eine Verstärkung des TrkA-spezifischen Signalwegs über die Bindung von NGF hinaus bedeuten. Es könnte ebenso, bei der gleichzeitigen Verfügung beider Faktoren, zu einer früheren Sättigung des Signalwegs führen, und so die Zellhomöostase schon bei geringen Konzentrationen der beiden Faktoren im umgebenden Milieu der allergischen Atemwegsentzündung aufrechterhalten. Inwiefern die beiden Neurotrophine auch eventuelle lokale Differenzierungsprozesse von B-Zellen zu Plasmazellen beeinflussen, ist ebenfalls eine ungeklärte Frage. Diese und gegebenenfalls existierende Wechselwirkungen von NT3 mit dem TrkA-Rezeptor müssten in weiteren Kulturexperimenten unter molekularbiologischen Gesichtspunkten analysiert werden. Eine weiterführende Charakterisierung der beteiligten Signalwege sowie deren Verschaltungen innerhalb der Zelle würden zu einem besseren Verständnis der noch unbekannten molekularen Überlebensstrategien von Plasmazellen führen.

4.2.2. NGF und NT3 regulieren die Expression antiapoptotischer Proteine in Plasmazellen

Die essentiellen intrazellulären Mechanismen für das Überleben von Plasmazellen sowie für die Regulierung der Langzeitimmunglobulinsynthese sind bisher nahezu ungeklärt. Die dafür notwendigen Signale werden ausschließlich von exogenen Faktoren vermittelt. So zeigen isolierte Plasmazellen des Knochenmarks *in vitro* nur ein verlängertes Überleben wenn sie entweder mit einzelnen Faktoren oder zusammen mit Knochenmark-Stromazellen kultiviert

werden (Minges Wols, Underhill et al. 2002; Minges Wols, Ippolito et al. 2007). Die für das Überleben essentiellen Faktoren sowie deren Wirkungsmechanismen konnten allerdings kaum charakterisiert werden. In dieser Arbeit sollte die Frage der Beteiligung antiapoptotischer Faktoren in kultivierten pulmonalen Plasmazellen nach NGF- bzw. NT3-Behandlung genauer untersucht werden.

Hinweise auf die an intrazellulären Überlebensmechanismen beteiligten Faktoren ergaben sich in dieser Arbeit durch den Vergleich der Expressionsunterschiede verschiedener antiapoptotischer Proteine in NGF-behandelten bzw. -unbehandelten Plasmazellen. Dabei konnte aufgrund der geringen Anzahl dieser Zellen bzw. deren geringe Überlebensrate in Kultur nur die Expression auf mRNA-Ebene bestimmt werden. Inwiefern diese auch die tatsächlichen Mengen des jeweiligen Proteins widerspiegeln, konnte aufgrund des geringen Materials nicht bestimmt werden, und müsste durch weitere Studien verifiziert werden. Die Stimulierung von isolierten pulmonalen Plasmazellen mit NGF führte hier, wie in Abb. 3.2.4. dargestellt, jedenfalls zu signifikant erhöhten Expressionen des antipoptotischen Faktors Bcl2, des Transkriptionsfaktors XBP1 und des Interleukins-6. Die erhöhte Bcl2-Expression durch NGF könnte dabei durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB verursacht worden sein. Es ist bekannt, dass es durch den NGF/TrkA-spezifischen Signalweg zur Aktivierung des *mitogen-activated protein (MAP)*-Kinase-Signalwegs kommt, in dessen Folge die Expression verschiedener Gene, die durch CREB reguliert werden, kommt (Finkbeiner 2000). Diese Aktivierung führte über die Bindung von CREB an das *cyclic AMP response element (CRE)* u.a. in B-Zellen zu einer verstärkten Bcl2-Expression, bei gleichzeitig verlängertem Überleben der Zellen (Wilson, Mochon et al. 1996; Pugazhenti, Miller et al. 1999). Die Vermittlung von Überlebenssignalen über die Aktivierung von CREB und dessen Zielgene scheinen dabei aber nicht nur auf das NGF beschränkt zu sein, sondern generell durch alle Neurotrophine reguliert zu werden. Eine Aktivierung von CREB führt aber nicht nur zur verstärkten Bcl2-Expression sondern auch zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und IL-6 in Immun- wie Strukturzellen (Finkbeiner 2000).

Eine weitere Möglichkeit für die Erhöhung der Bcl2-Expression könnte die verstärkte Expression bzw. Aktivierung von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-kappaB)* sein. Dieser als Masterregulator des Immunsystems bekannte Transkriptionsfaktor reguliert ebenfalls die Expression von Bcl2. Wie in Abb. 3.3. dargestellt, konnte bei weiteren Kulturexperimenten mit NGF- bzw. NT3-stimulierten, *in vitro* generierten Plasmazellen konnte eine erhöhte mRNA Expression der funktionalen Untereinheit RelA/p65 beobachtet werden. Diese Untereinheit ist über die Interaktion mit

anderen Kofaktoren sowohl an der Aktivierung als auch an der Inaktivierung von bestimmten Genen beteiligt. Inwiefern die beobachtete Zunahme der NF-kappaB Expression zu der Regulierung antiapoptotischer Prozesse innerhalb der Zelle z.B. über die Suppression von proapoptotischen Genen oder der verstärkten Expression antiapoptotischer Gene führt, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Die Bedeutung von NF-kappaB für die Regulation zahlreicher zellulärer Vorgänge macht dieses Protein zu einem potentiellen Kandidaten für die Vermittlung der Plasmazellhomöostase.

Weiterhin konnte innerhalb dieser Arbeit eine signifikante Zunahme der XBP1-mRNA Expression nach NGF-bzw. NT3-Stimulation beobachtet werden (siehe Abb. 3.2.4 & 3.3.). Das XBP1-Protein ist ein Transkriptionsfaktor mit einer charakteristischen *basic leucine zipper (bZIP)*-Domäne, und ist an der Regulation der Expression verschiedener Proteine der Proteinsynthese und des Differenzierungsprozesses beteiligt. XBP1 bindet, genau wie CREB, an *CRE*-ähnliche Sequenzen innerhalb der Promotorregionen der betreffenden Zielgene (Liou, Boothby et al. 1990). Die Bedeutung von XBP1 für die Population der B- bzw. Plasmazellen konnte bereits in zahlreichen Studien bestimmt werden. So zeigten Genexpressionsanalysen verschiedener B-Zellstadien, dass die stärkste XBP1-Expression in Plasmazellen stattfindet (Reimold, Ponath et al. 1996). Andere Zelltypen wie z.B. T-Zellen oder Strukturzellen weisen XBP1-Expressionen nur temporär und nur sehr schwach auf. XBP1 wird somit als Plasmazell-spezifischer Faktor angesehen. Die Expression von XBP1 wird während der Differenzierung zur Plasmazelle über einen weiteren Plasmazell-spezifischen Transkriptionsfaktor, Blimp1, reguliert. Aber auch weitere Proteine sind an der Regulation von XBP1 beteiligt. Die besondere Bedeutung von XBP1 für die Generierung von Plasmazellen und die Antikörperproduktion konnte in weiteren Experimenten mit Mäusen mit B-Zell-spezifischer XBP1-Defizienz charakterisiert werden. In diesen Mäusen konnte nicht nur eine drastische Reduktion der Immunglobulinkonzentration aller Isotypen im Serum, sondern auch eine Reduktion der Plasmazellanzahl festgestellt werden. Die vorhandenen Plasmazellen besaßen darüber hinaus eine stark veränderte Golgi- bzw. ER-Morphologie. Die Bedeutung von XBP1 innerhalb entzündlicher Prozesse sowie im Überleben von Plasmazellen ist bisher ungeklärt. *In situ* Hybridisierungsexperimente konnten bisher die Expression von XBP1 in Plasmazellen lokal im entzündeten Synovium von Rheuma-Patienten nachgewiesen werden (Iwakoshi, Lee et al. 2003; Iwakoshi, Lee et al. 2003).

Die vielleicht wichtigste Rolle von XBP1 innerhalb der Zelle ist dabei die Vermittlung und Regulierung der *Unfolded Protein Response (UPR)*, eines antiapoptotischen Mechanismus zur Reduktion von intrazellulärem ER-induzierten Stress. Dieses Signalsystem eukaryotischer

Zellen sichert die korrekte Faltung, Prozessierung und den Export, aber auch die Degradierung von ER-luminalen Proteinen (Credle, Finer-Moore et al. 2005; Todd, Lee et al. 2008). Durch eine verstärkte Anhäufung missgefalteter Proteine im ER-Lumen kommt es zur Aktivierung UPR-spezifischer Signalwege. Die UPR von Säugerzellen ist dabei in drei unterschiedliche Signalwege unterteilt. Der am stärksten konservierte ist der XBP1/IRE1-vermittelte Signalweg. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei die ER-membranständige Endoribonuklease und Kinase *ER to nucleus signaling 1 (IRE1)*, welche durch Anhäufung missgefalteter Proteine im Lumen aktiviert wird (Wang, Harding et al. 1998; Wang, Kuroda et al. 1998; Credle, Finer-Moore et al. 2005; Kimata, Ishiwata-Kimata et al. 2007), und die im Cytosol-lokalisierte XBP1-mRNA schneidet. Der durch dieses unkonventionelle Splicen (*XBP1-Splicing-XBP1(S)*) generierte, neue C-Terminus beinhaltet eine potente Transaktivator-Domäne (Yoshida, Matsui et al. 2001; Calfon, Zeng et al. 2002; Lee, Tirasophon et al. 2002). Ungesplicte mRNA von XBP1 wird hingegen rasch im Cytosol abgebaut. XBP1 verstärkt hauptsächlich die Expression von Proteinen, die an der Expression und Faltung sekretorischer Proteine essentiell beteiligt sind, wie z.B. Chaperone (Shaffer, Shapiro-Shelef et al. 2004; Sriburi, Jackowski et al. 2004). Dieses ER-Qualitätsmanagement soll die Zelle vor der toxischen Anhäufung von sekretorischen Proteinen und der damit einhergehenden Induktion der Apoptose bewahren. Dieser Mechanismus steht außerdem im Verdacht, für die Zellhomöostase sekretorisch besonders aktiver Zellen von essentieller Bedeutung zu sein. Die Bedeutung für eine Regulierung der Langzeitimmunglobulin-Produktion ist somit eine interessante, gleichwohl ungeklärte Frage. Bisherige Studien auf diesem Gebiet wurden fast ausschließlich mit Hilfe von Myelomazellen durchgeführt. Diese Tumorzellen besitzen von sich aus ein großes Überlebenspotential, und können somit nicht die realen Bedingungen primärer Plasmazellen widerspiegeln. Die Regulation dieses intrinsischen Prozesses durch exogene Faktoren ist ebenso nahezu ungeklärt. Bisher konnte nur IL-4 als ein XBP1-regulierender Faktor identifiziert werden. IL-4 induziert dabei die B-Zellaktivierung, Proliferation, Immunglobulinsynthese bzw. Klassenwechsel zu IgE, die Verhinderung der Apoptose sowie die verstärkte XBP1-Expression in reifen B-Zellen.

Die hier gezeigte erhöhte XBP1-Produktion durch NGF/TrkA-Signaling in primären Plasmazellen, wie in Abb. 3.2.4 dargestellt, wurde bisher noch nicht beschrieben. Eine mögliche Erklärung für diese verstärkte Expression bietet die Aktivierung der p38 MAP-Kinasen durch den NGF/TrkA-Signalweg (Patapoutian and Reichardt 2000). Jene Kinase-Familie führt nach ihrer Aktivierung nicht nur zur Aktivierung von CREB, sondern auch zur Aktivierung der *activating transcription factors (ATF)*-Familie (Tan, Rouse et al. 1996).

Darunter befindet sich das ATF6-Protein (Luo and Lee 2002), ein ebenfalls durch ER-Stress regulierter Transkriptionsfaktor, welcher u.a. die XBP1-Expression bestimmt (Haze, Yoshida et al. 1999; Yoshida, Matsui et al. 2001; Brewer and Hendershot 2005). Die Zugabe von NGF bzw. NT3 zur Plasmazellkultur konnte in dieser Arbeit so nicht nur eine erhöhte XBP1-Produktion induzieren, sondern führte ebenso zu einer verstärkten Expression zweier charakteristischer XBP1-Zielgene, *Heat-shock-protein a 5 (Hspa5)* und *ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1 (Edem1)* (siehe Abb. 3.3). Hspa5/Bip ist als Chaperon essentiell an der korrekten Faltung un- bzw. missgefalteter Proteine innerhalb des ER beteiligt. Eine weitere wesentliche Funktion ist aber auch die Aktivierung der Endoriobnukleasefunktion von IRE1. So könnte es über eine verstärkte Hspa5-Expression zu einer positiven Rückkopplung für die Aktivierung von XBP1 führen, was wiederum eine verstärkte Expression der Zielgene zur Folge hätte.

Zur Aufrechterhaltung der ER-Homöostase gehört ebenfalls der geregelte Abbau „schädlicher“ Proteinen mittels des im Cytosol lokalisierten Proteasoms. Eine unterschiedliche Edem1-Expression in Folge der Gabe von NGF bzw. NT3 könnte auf eine differenzierte Regulation des Faktors durch die beiden Neurotrophine hinweisen. Edem1 ist maßgeblich an der Vermittlung des Exports von missgefalteten Proteinen aus dem ER zum Abbau im Cytosol beteiligt (Olivari and Molinari 2007). Seine mRNA-Expression wird, wie in Abb. 3.3. dargestellt, anscheinend durch den NGF/TrkA-Signalweg herunterreguliert während die Stimulierung mit NT3 zu einer erhöhten Expression der spezifischen mRNA führte. Beide Neurotrophine vermitteln Signale über ihren spezifischer Trk-Rezeptor, deren Signalwege zwar als identisch beschrieben wurden, aber dennoch über die Verknüpfung verschiedener Signalwegkomponenten zu einer differenzierten Regulation dieses Gens führen könnten. Auch verschiedene Abstufungen intrazellulären Stresses in den verwendeten Zellen könnten zu einer differenzierten Edem1-mRNA-Expression nach der Neurotrophinbehandlung führen. Die hier beobachteten Änderungen der Expression von XBP1, Hspa5 und Edem1 sowie NF-kappaB geben erste Hinweise auf die Beteiligung der UPR-spezifischen Signalwege bei der Regulation des Plasmazellüberlebens.

Der Einfluss der p38-MAPK auf das Überleben von Plasmazellen wurde ebenfalls bisher nicht näher untersucht. Ihr spezifischer Signalweg konnte aber bereits mit entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoider Arthritis oder der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht werden (Johnson and Bailey 2003; Hollenbach, Neumann et al. 2004). Die p38-MAPK reguliert innerhalb dieser Erkrankungen u.a. die Produktion von IL-6, TNF- α und IL-1 β (de Silva, Davis-Kaplan et al. 1997), aber auch die Produktion von Adhäsionsmolekülen

wie VCAM-1 (Pietersma, Tilly et al. 1997) oder die Proliferationsfaktoren GM-CSF und CD-40 (Lee, Laydon et al. 1994; Kummer, Rao et al. 1997). Die Rolle von p38-MAPK im NGF-vermittelten Signaling ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. So führt die Aktivierung des TrkA-Signalweges zur Aktivierung von p38-MAPK und nachgeschaltet zur Entwicklung und Aufrechterhaltung von Immunzellen (Zarubin and Han 2005). Die Abwesenheit von NGF aber führt zur gleichzeitigen Aktivierung von p38-MAPK und zur Induktion der Apoptose (Xia, Dickens et al. 1995; Henkart 1996; Juo, Kuo et al. 1997). Inwiefern diese beiden Mechanismen miteinander korrelieren bzw. inwiefern diese über andere Signalwege reguliert werden, ist aber noch unbekannt. Die Entscheidung welcher Mechanismus aktiviert wird, scheint von Zelltyp-spezifischen Gegebenheiten anhängig zu sein. Da Plasmazellen, bedingt durch ihre Funktion als Immunglobulin-produzierende Zellen, über eine stark ausgeprägte ER-Maschinerie verfügen, ist eine streng regulierte Qualitätskontrolle des ERs von essentieller Bedeutung für die Vermeidung von intrazellulärem Stress und die dadurch verursachte Induktion der Apoptose. Eine durch exogene Faktoren verstärkte Expression des XBP1-Proteins oder weiterer Faktoren wie ATF6 könnte über die Aktivierung antiapoptotischer Mechanismen zu einer Aufrechterhaltung der ER-Homöostase und somit zu einer geregelten Proteinsynthese über einen längeren Zeitraum führen. Das hier detektierte Auftreten einer NGF-abhängigen verstärkten XBP1-mRNA-Expression sowohl in isolierten pulmonalen als auch in *in vitro* generierten Plasmazellen deutet auf einen generellen Mechanismus für die Regulierung von XBP1 innerhalb der Zellpopulation hin. Da *in vitro* generierte Plasmazellen gegenüber den isolierten pulmonalen Plasmazellen immer noch geringe Proliferationsaktivitäten zeigen, könnte eine durch NGF-induzierte verstärkte XBP1-Expression ebenfalls eine wesentliche Rolle während des Differenzierungsprozesses lokaler pulmonaler Plasmazellen innerhalb des Mikromilieus der allergischen Atemwegsentzündung spielen. Die vollständige Reifung von Plasmazellen kann derzeit in *in vitro* nicht erreicht werden, da zur vollständigen Reifung der Plasmazelle die Beteiligung gewebsspezifischer Faktoren essentiell zu sein scheinen.

Eine weitere wichtige Rolle in der Regulation von XBP1-vermittelten Signalen wird IL-6 zugeschrieben. Dieses proinflammatorische Zytokin wird z.B. von T-Zellen und Makrophagen gebildet, und wurde bisher als ein kritischer Faktor für die späte Plasmazelldifferenzierung und als Wachstumsfaktor für Myelomazellen angesehen (Kishimoto 1989). Es spielt aber auch in Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder der mesangialen Glomerulonephritis eine regulierende Rolle (Horii, Muraguchi et al. 1989; Miyasaka, Sato et al. 1989; Mihara, Moriya et al. 1995; Samoilova,

Horton et al. 1998). Genetische IL-6-Überexpressions bzw. -Deletionsmutanten der Maus zeigen die Ausbildung von Plasmazytomen bzw. schwere Defizite in der IgG und IgA Produktion (Kishimoto 1989; Kopf, Le Gros et al. 1995; Kovalchuk, Kim et al. 2002). Des Weiteren resultiert eine Rekonstruktion der XBP1-Expression in XBP1^{-/-} B-Zellen in einer gesteigerten IL-6-Produktion. Diese und andere Studien führen zu der Annahme der Existenz einer positiven Rückkopplung zwischen IL-6 und XBP1. Diese würde zu einer kontinuierlich hohen Produktion der beiden Proteine innerhalb der Zelle führen. Die hier detektierte erhöhte IL-6 bzw. XBP1 Produktion in den primären NGF-behandelten pulmonalen Plasmazellen könnte durchaus auf einen solchen Mechanismus zurückzuführen sein. Auch andere Proteine wie CREB oder auch NF-kappaB regulieren die IL-6 Produktion (Akira and Kishimoto 1997). Die Frage wäre dabei, inwiefern XBP1 die Funktion von IL-6 in Plasmazellen kontrolliert bzw. welche Rolle die beiden im Überleben der Zellen einnehmen. Auch die Beteiligung posttranskriptionaler Mechanismen mittels microRNA könnte bei der XBP1-Expression eine Rolle spielen. Denn weder in IL-6 noch IL-4 defizienten Mäusen konnten drastische Defekte bei der Plasmazellgenerierung beobachtet werden (Iwakoshi, Lee et al. 2003).

Die mögliche Regulierung des Überlebens von Plasmazellen und somit die Aufrechterhaltung einer Langzeitimmunglobulinsynthese über das komplexe Netzwerk der UPR ist eine wichtige Fragestellung für die Aufklärung der humoralen Gedächtnisimmunantwort. Inwiefern dieser Mechanismus über den NGF/TrkA oder NT3/TrkC-Signalweg, sowie durch die Beteiligung der p38-MAPK modifiziert wird ist bisher völlig ungeklärt. Die Beantwortung dieser Frage könnte aber wesentliche Erkenntnisse über die Regulation intrazellulären Stresses sowie die Regulation der Zellhomöostase im Allgemeinen bringen.

4.2.3. Differenzierte Rolle des TrkA-Rezeptors in MNCs der Lunge und Milz

Der NGF-spezifische TrkA-Rezeptor ist ein hochspezifisches Mitglied der Rezeptor Tyrosinkinasen, welcher eine Vielzahl von Effektorfunktionen aufweist. In verschiedenen Studien konnte die Expression des Rezeptors nicht nur auf neuronalen Geweben, sondern auch auf verschiedenen Immunzellen nachgewiesen werden (Freund-Michel and Frossard 2008). Hier kann er über die Vermittlung spezifischer Signale die Differenzierung, Proliferation und die Balance zwischen Überleben und Apoptose in den betroffenen Zellen regulieren. Die Bedeutung des Rezeptors innerhalb der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen wie dem allergischen Asthma ist dabei nahezu unbekannt. Die Frage der Bedeutung von TrkA für das Überleben der mononukleären Zellpopulation der Lunge

sollte in dieser Arbeit daher etwas näher beleuchtet werden. Die mononukleären Zellen umfassen dabei die lokalen Lymphozyten- und Makrophagenpopulationen in der Lunge. Durch die in dieser Arbeit induzierten Reduktion der TrkA-spezifischen Expression in pulmonalen MNCs über die Transfektion einer TrkA-spezifischen siRNA, führte zu einer signifikanten Verminderung der Bcl2-spezifischen mRNA-Expression innerhalb der Zellen (siehe Abb. 3.4.1b/c). Gleichzeitig konnte eine Verschlechterung der Zellvitalität und eine erhöhte Aktivitäten Caspasen-3 und -7 festgestellt werden (siehe Abb. 3.4.2a/b).

Die MNCs der Milz zeigten unter den gleichen Bedingungen keinerlei Beeinträchtigung der Zellvitalität oder der Bcl2-spezifischen mRNA-Expression (siehe Abb. 3.4.1.). Dieser Unterschied könnte auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. So könnten die MNCs der Lunge eine viel stärkere Abhängigkeit der Zellen von der Vermittlung überlebenswichtiger Signale durch den NGF/TrkA-Signalweg aufweisen. Dieses würde wiederum eine verstärkte Adaption dieser Zellen an das vorherrschende NGF-Milieu bedeuten. Diese Möglichkeit wird von der Beobachtung gestützt, dass es nur möglich war, im Überstand der pulmonalen MNC-Fraktion das Neurotrophin NGF in hohen Konzentrationen nachzuweisen. In den Zellkulturüberständen der Milz war dies dagegen nicht möglich. Die MNCs der Milz produzieren hier wahrscheinlich nur sehr geringe Konzentrationen von NGF, die über die verfügbaren Nachweissysteme nicht mehr messbar sind. Der Nachweis von NT3 in den Überständen der beiden Organe führte zu keinem Ergebnis, weshalb dessen Rolle nicht weiter bestimmt wurde. Des Weiteren könnten die fehlenden Signale des TrkA-Rezeptors in transfizierten Zellen der Milz durch andere essentielle Faktoren kompensiert werden. Dies würde wiederum eine Adaption der Zellen an das lokal vorherrschende Zytokininmilieu in der Milz bedeuten, wobei das NGF eine untergeordnete Rolle besäße. Dieses Milieu wäre vermutlich eher durch die von lokalen, aktivierten CD4⁺ T-Zellen sezernierten TH₂ Zytokine wie z.B. IL-4 und IL-5 dominiert. Inwiefern aber die einzelnen Zellpopulationen der MNCs, die CD4⁺ T-Zellen, Makrophagen oder B-Zellen der verschiedenen Organe, individuell durch die Behandlung beeinflusst werden, oder ob eine indirekte Regulierung des Überlebens durch andere Faktoren besteht, stellt eine interessante Fragestellung dar.

Die Bedeutung von NGF und dessen Rezeptor für das allergische Entzündungsmilieu konnten durch frühere *in vitro* und *in vivo* Studien näher bestimmt werden. Dort führte die Neutralisierung von NGF zur Reduktion der Entzündung (Braun, Appel et al. 1998). Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführte Inhibierung der TrkA-Expression führte zu einer verminderten Antikörperproduktion 72 h nach der Transfektion der siRNA in behandelten MNCs der Lunge aber nicht in der Milz (siehe Abb. 3.4.2c.). Diese Reduktion bei gleichzeitig

verstärkter Caspaseaktivitäten der pulmonalen MNCs deutet dabei auf die Induktion apoptotischer Mechanismen hin. Diese führen zum Tod der Zellen und bedeuten den Verlust der Antikörperproduktion. Die im Gegensatz dazu unveränderte Antikörperproduktion der MNCs der Milz könnte aufgrund der Vermittlung des Überlebens von präsenten Antikörpersezernierenden Zellen durch TrkA-unabhängige Signalen sein.

Der hier sehr geringe Anteil detektierter IgE-Antikörper im Zellkulturüberstand beider Organe könnte eine Folge der überwiegend polyklonalen Aktivierung durch Zugabe von SAC sein (Li, Krajewski et al. 1997), da diese bevorzugt zur Bildung von Antikörpern der Klasse IgG und weniger zu IgE führt. Eine Aktivierung vorhandener B-Gedächtniszellen innerhalb der isolierten MNC-Fraktion könnte in beiden Organen zu den basalen IgE-Spiegeln geführt haben.

Insgesamt betrachtet unterstreichen die hier beobachteten Unterschiede zwischen MNCs der Lunge und Milz die Bedeutung des NGF/TrkA-Signalwegs für die lokale Antikörperproduktion bzw. das Überleben von Entzündungszellen der Lunge und stützen die Vermutung einer jeweiligen Adaption an das vorherrschende Milieu.

4.3. Rolle von NGF/TrkA für die lokale Antikörperproduktion innerhalb der allergischen Atemwegsentzündung

Annähernd alle Immunzellen innerhalb der allergischen Atemwegsentzündung sind in der Lage, NGF bzw. dessen Rezeptor TrkA zu exprimieren. Es ist daher anzunehmen, dass der Entzündungsprozess durch die NGF-vermittelten Signale aktiv beeinflusst wird. Im Mausmodell des allergischen Asthmas konnte, wie bereits erwähnt, ein verstärkender Effekt von NGF auf die IgE, IgG1 und TH₂-Zytokinproduktion nachgewiesen werden (Braun, Appel et al. 1998; Quarcoo, Schulte-Herbruggen et al. 2004). Weiterhin demonstrierten weitere *in vitro* Studien die Bedeutung von NGF als autokrinen Überlebensfaktor für B-Zelllinien (Torcia, Bracci-Laudiero et al. 1996). Die Allergensensibilisierung führt zur Ausbildung einer TH₂-Antwort mit gleichzeitiger Produktion von lokalem NGF. Die NGF-vermittelten Signale könnten somit zu einer verstärkten bzw. kontinuierlichen IgE-Produktion und so unweigerlich zu einer erhöhten allergenreaktiven Mastzellpopulation führen. Dies würde eine Verstärkung der existierenden TH₂-Immunantwort bedeuten. Die Regulierung der lokalen Antikörperproduktion durch das Überleben von Plasmazellen würde somit einen entscheidenden Einfluss auf den chronischen Verlauf des Entzündungsprozesses bedeuten. Der in dieser Arbeit beobachtete positive Effekt von NGF/TrkA auf das Überleben von

pulmonalen Plasmazellen *in vitro* sollte daher durch die Blockierung des TrkA-Signalwegs *in vivo* mittels des Mausmodells des allergischen Asthmas untersucht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit intranasale Verabreichung geringer Konzentrationen des spezifischer TrkA-Inhibitors bei allergischen Mäusen führte nicht nur zu einer dramatischen Reduktion der Antikörper-sezernierenden Zellen (ASC) lokal in der Lunge, sondern auch zu einer Reduktion der Allergen- und Gesamt-IgE-Titer im Serum der Tiere. Diese Beobachtungen verdeutlichen die Rolle sowohl von NGF als auch von TrkA für die lokale Antikörperproduktion der Lunge. Mittels Durchführung eines weiteren Experimentes mit Hilfe NGF-transgener Mäuse konnte diese Rolle weiter bekräftigt werden. Diese Tiere sezernieren kontinuierlich NGF über die Zellen des Atemwegsepithels (Hoyle, Graham et al. 1998), und besitzen somit einen stark erhöhten lokalen NGF-Spiegel aufgrund der gleichzeitigen Produktion von NGF durch das Atemwegsepithel als auch durch die infiltrierenden Immunzellen nach der Induzierung der allergischen Atemwegsentszündung durch die Allergen-Sensibilisierung und anschließende Allergen-Inhalation (Quarcoo, Schulte-Herbruggen et al. 2004). Der semiquantitative Nachweis von ASC in der Lunge mittels spezifischer Immunfluoreszenzfärbung in diesen Tiere zeigte auch nach zwölfwöchiger Allergeninhalation eine signifikant erhöhte Anzahl der Zellen verglichen mit den Wildtypkontrollen. Zudem bewirkt diese Allergenprovokation die Progression der Atemwegsumbauprozesse. Die beobachtete Zunahme könnte so durch eine durch NGF-induzierte verstärkte Differenzierung lokaler, aktivierter B-Zellen, infiltrierter Plasmablasten aufgrund der kontinuierlichen Allergeninhalation verursacht sein. Aber auch ein durch das NGF-Milieu-vermitteltes Überleben reifer Plasmazellen könnte ursächlich für die Unterschiede der NGFtg als auch der Wildtypiere sein.

Die in dieser Arbeit untersuchten B-Zellen / Plasmazellen der Milz scheinen von der TrkA-Inhibition dagegen nicht beeinflusst zu sein; die Anzahl an Antikörper-sezernierenden Zellen weist im Vergleich zur Lunge keine Veränderung auf. Dies ist höchstwahrscheinlich der lokalen Verabreichung über die Trachea geschuldet. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass trotz intranasaler Gabe geringe Mengen des Inhibitors über den Blutkreislauf in die Milz gelangt sind und dort die Blockierung der lokalen TrkA-Rezeptoren verursacht haben könnten. Trotz dieser Möglichkeit konnte jedoch keine Änderung der ASC-Anzahl beobachtet werden, was die lokale Bedeutung des NGF/TrkA-spezifischer Signalwegs für die Lunge bekräftigt (siehe Abb. 5). Der deutliche Unterschied der Anzahl von ASCs in der Lunge und der Milz nach der systemischen Sensibilisierung ohne anschließende Allergeninhalation ist ebenso auffällig. Die hohe Anzahl der ASCs der Milz verglichen zu der

geringen Anzahl innerhalb der Lunge (< 1) ist auf die Ausbildung langlebiger Plasmazellen in der Milz schon während der Sensibilisierungsreaktion zurückzuführen. Dies würde bedeuten, dass es bereits während der ersten Reaktion gegen ein Allergen zur Ausbildung einer Gedächtnisimmunantwort über die Langzeitproduktion Allergen-spezifischer Antikörper kommt, was die Pathogenese allergischer Erkrankungen entscheidend beeinflussen könnte. Diese Vermutungen werden durch die Arbeiten von Luger und Kollegen gestützt, die die Milz und das Knochenmark als Orte von Überlebensnischen für die Langzeitantikörperproduktion im Mausmodell des allergischen Asthma identifizieren konnte (Luger et al. akzeptiert für Publikation).

Die gleichzeitig stattfindende signifikante Abnahme der IgE-Spiegel im Serum 24 Stunden nach der TrkA-Inhibitorgabe weist zugleich auf die essentielle Bedeutung der Lunge als Quelle für die Ausbildung des systemischen IgE-Titers hin. Der rasche Anstieg der IgE-Konzentration im Serum direkt nach Allergeninhalation der Tiere, zusammen mit einer starken Zunahme Allergen-spezifischer Plasmazellen in der Lunge, bekräftigt die Rolle der Lunge, zumindest an der initialen IgE-Produktion nach Allergenkontakt beteiligt zu sein. Inwiefern die Lunge allerdings zu einer kontinuierlich auftretenden IgE-Konzentration im Organismus beiträgt, könnte nur über die Induktion einer stabilen, chronischen allergischen Entzündung in der Mauslunge bestimmt werden. Da für die Aufrechterhaltung der allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge der Tiere jedoch eine kontinuierliche Allergeninhalation notwendig ist, wäre diese Untersuchung nur über die Gabe eines Allergen-unabhängigen Stoffes, möglich, welcher den bereits existierenden Entzündungsprozess aufrechterhält ohne die Bildung bzw. Infiltration neuer Plasmablasten/zellen zu provozieren. Die Bedeutung anderer Organe wie z.B. des Knochenmarks und der Milz für die Aufrechterhaltung des IgE-Spiegels als Überlebensnischen langlebiger Plasmazellen muss dabei ebenfalls beachtet werden. Ein weiterer Hinweis für ihre Bedeutung ist die leichte Zunahme der IgE-Titer an Tag 10 nach der TrkA-Inhibitorgabe trotz nahezu vollständiger Auflösung der lokalen allergischen Entzündungsreaktion. Ein auf niedrigem Niveau existierender IgE bzw. IgG1-Spiegel nach Reduktion der Atemwegsentzündung konnte ebenfalls durch Luger und Kollegen beobachtet werden und ist ein Charakteristikum der humoralen Gedächtnisantwort über die Ausbildung langlebiger Plasmazellen (Radbruch, Muehlinghaus et al. 2006).

Die hier gleichzeitig beobachtete nur geringfügig reduzierten Konzentrationen der Allergen-spezifischen IgG1 und IgG2a Antikörper ist durch die hohe Halbwertszeit der IgG Antikörper von >10 Tagen bedingt, welche ebenfalls, bedingt durch die gemessenen Zeitpunkte, die

Auftrennung eines Unterschiedes erschweren. Murine IgE-Antikörper dagegen besitzen, wenn sie nicht an FcεRI/RII gebunden vorliegen, eine sehr kurze Halbwertszeit von nur 12h (Vieira and Rajewsky 1988). Die Unterschiede könnten ebenfalls auf eine gesteigerte Sensitivität der pulmonalen IgE- gegenüber IgG1- bzw. IgG2a-sezernierenden ASC auf die NGF/TrkA-spezifischen Signale zurückzuführen sein. Dagegen sprechen aber die bereits beobachtete Reduktion der IgG1-Antikörper mit gleichzeitiger Verminderung der Zellvitalität in der siRNA behandelten pulmonalen MNC-Kultur. Unsere Ergebnisse werden durch eine frühere Studie gestützt, welche durch den Einsatz von Anti-NGF-Antikörpern eine Reduktion von IgG1- und IgE in der Kultur beobachten konnten (Braun, Appel et al. 1998).

Weiterhin stellt sich die Frage, inwiefern die Reduktion der ASC-Anzahl über direkte oder indirekte Wirkung oder beides zusammen induziert wurde. Dies würde bedeuten, dass durch die Blockierung der ATP-Bindetasche des Rezeptors und somit die verhinderte Aktivierung des Rezeptors (Lippa, Morris et al. 2006; Santos, Verveer et al. 2007) direkt vermittelte, essentielle Signale für die Antikörper-sezernierende Zelle fehlten, was zu einer Verschiebung der vorhandenen Balance zwischen antiapoptotischen und apoptotischen Mechanismen zu Gunsten der Apoptose führen könnte. Die Aktivierung des TrkA-spezifischen Signalswegs durch NGF-Bindung würde so zu einer verstärkten Bcl2 und XBP1-Expression sowie einer verstärkten NF-κappaB Expression/Aktivierung führen, die die Induktion apoptotischer Mechanismen verhindern. Die Blockierung der ER-Stress induzierten Apoptose über den XBP1-vermittelten Signalweg wird hierbei als ein essentieller Mechanismus für das Überleben von Plasmazellen angesehen (Brewer and Hendershot 2005). Eine weitere Möglichkeit ist eine indirekt induzierte Apoptose durch das Fehlen anderer TrkA-Rezeptor-positiver Zellen innerhalb des Entzündungsgeschehens. Da die sich innerhalb der allergischen Atemwegsentzündung lokalisierten Makrophagen, Mastzellen, eosinophile Granulozyten sowie die T-Zellpopulation ebenfalls den TrkA-Rezeptor exprimieren, sind sie somit ebenfalls anfällig für dessen Inhibierung über den verabreichten Inhibitor. Diese Zellen bilden gemeinsam durch ihre sezernierten Zytokine und Chemokine (z.B. IL-4, IL-5, IL-6 und CXCL10) ein Mikromilieu, in dem das NGF nur ein charakteristischer Vertreter ist (siehe Abb. 5). Durch die Blockierung des TrkA-Inhibitors, z.B. auf CD4⁺ T-Zellen oder Mastzellen, würden diese Zellen ebenfalls aus dem Entzündungsprozess entfernt, was nachfolgend zur Reduktion der von ihnen gebildeten Faktoren führen würde. Dieses Fehlen anderer, unbekannter Überlebensfaktoren könnte somit indirekt zum Verlust der Antikörper-sezernierenden Zellen innerhalb der Entzündung führen. Die Abhängigkeit dieser Zellen einzig von NGF ist eher als unwahrscheinlich anzusehen, da andere Studien auf synergistische

Effekte verschiedener Faktoren hinweisen. Weitere vielversprechende Kandidaten für Überlebensfaktoren peripherer B- bzw. Plasmazellen sind die Mitglieder der TNF-Superfamilie BAFF und APRIL. Diese Faktoren werden von Struktur- wie Immunzellen gebildet, und vermitteln über die Bindung an die auf der Plasmazelloberfläche vorhandenen Rezeptoren BAFFR und BCMA lebenswichtige Signale für die (Avery, Kalled et al. 2003; O'Connor, Raman et al. 2004). Weitere Faktoren sind u.a. das Adhäsionsmolekül V-LA-4 (Minges Wols, Underhill et al. 2002; Cassese, Arce et al. 2003) oder das Zytokin Interleukin-10. Dieses ebenfalls in der allergischen Atemwegsentzündung präsente Zytokin vermittelt die Differenzierung von B-Gedächtniszellen (Arpin, Banchereau et al. 1997; Tangye, Avery et al. 2003) zu Plasmazellen und verstärkt das Überleben von humanen Myelomazellen (Lu, Zhang et al. 1995). Die lokale Verabreichung des TrkA-Inhibitors innerhalb dieser Arbeit könnte zusammenfassend gesehen einerseits zum Verlust der direkt über TrkA vermittelten Signale und andererseits zum Verlust anderer essentieller, exogener Signale durch das Sterben anderer NGF-abhängiger Zellen geführt haben. Diese Hypothese wird insofern gestützt, als dass es nach der Verabreichung des Inhibitors insgesamt zu einer starken Reduktion der Entzündungszellen aufgrund apoptotischer Mechanismen kam. Dabei ist vor allem die Zahl der eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten reduziert, während die Makrophagenpopulation unverändert bleibt. Die eosinophilen Granulozyten weisen dabei sogar eine signifikante Reduktion auf, was deren Sensitivität von den NGF/TrkA-vermittelten Signalen früherer Arbeiten nochmals bestätigt (Hahn, Islamian et al. 2006).

Die für das Überleben von Plasmazellen notwendigen Signale bzw. Mechanismen und eine damit verbundene Regulierung der Langzeitantikörperproduktion innerhalb allergischer Erkrankungen sind bisher nahezu ungeklärt. Die Charakterisierung der Rolle von NGF und dessen Rezeptor TrkA für das Überleben von lokalen, pulmonalen Plasmazellen *in vitro* sowie im Mausmodell des allergischen Asthmas ermöglicht nicht nur neue Erkenntnisse für die Regulation lokaler Antikörperproduktion innerhalb von Entzündungsprozessen, sondern ermöglicht auch die Gewinnung neuer Erkenntnisse über die Immunpathogenese der Erkrankung. Die weitere Untersuchung des Überlebensmechanismus dieser Zellen sowie deren Rolle in der aktiven Regulation des Entzündungsgeschehens unabhängig von der Antikörperproduktion sind dabei wichtige Schritte im Verständnis der Erkrankung.

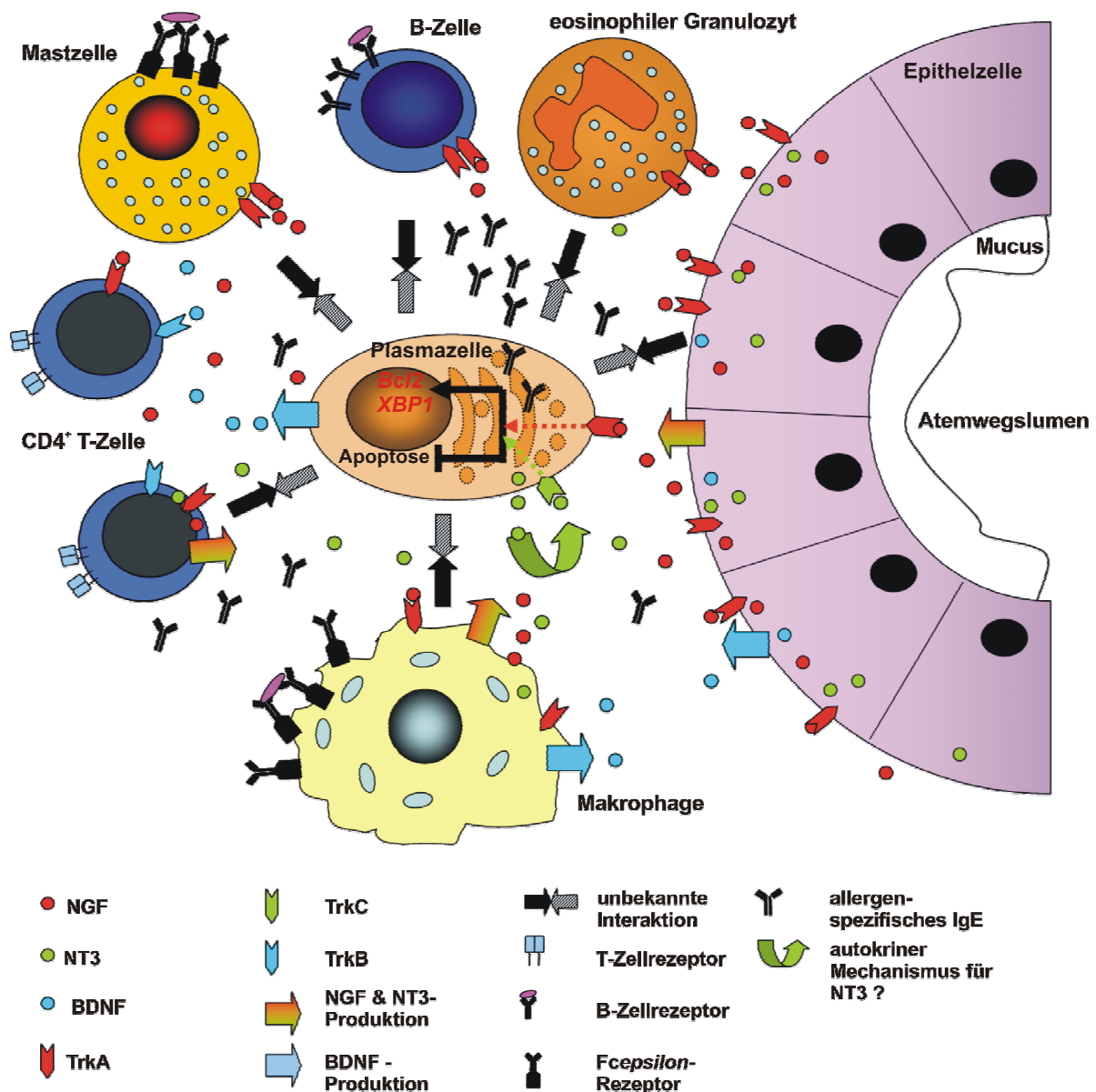


Abb. 5.: NGF-vermitteltes Überleben pulmonaler Plasmazellen in der allergischen Atemwegsentszündung.

Das von anderen Immunzellen bzw. Atemwegsepithelzellen produzierte NGF, vermittelt über die Bindung seines spezifischer TrkA-Rezeptor die verstärkte Expression von Bcl2, XBP1 und anderer antiapoptotischen Proteine und das Überleben der Zelle. Über einen möglichen autokrinen Mechanismus des NT3/TrkC-Signalwegs könnte es zu einer Verstärkung dieses Effektes führen. Pulmonale Plasmazellen produzieren ebenfalls das Neurotrophin BDNF dessen Rezeptor TrkB u.a. auf CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird. Die Existenz direkter Interaktionen zwischen Den Plasmazellen und lokalen Immunzellen bzw. Strukturzellen über Adhäsionskontakte oder die Sekretion löslicher Faktoren ist bisher unbekannt.

4.4. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit war es erstmals möglich, die Beteiligung lokaler Faktoren für das Überleben von pulmonalen, reifen Plasmazellen innerhalb der allergischen Atemwegsentzündung *in vitro* und *in vivo* nachzuweisen. Die Neurotrophine NGF und NT3 konnten als erste potentielle Faktoren einer Überlebensnische der Atemwegsmukosa identifiziert und ihre regulatorische Eigenschaft in der Expression anti-apoptotischer Faktoren nachgewiesen werden. Daraus ergeben sich folgende weiterführende Fragestellungen, die wir in Folgeexperimenten untersuchen möchten. Hierzu zählen:

1. die Beteiligung der reifen, pulmonalen Plasmazellen an einem persistierenden systemischen IgE Spiegel sowie die Unabhängigkeit ihres Überlebens von Allergenen. Durch die bereits erwähnte Stabilisierung der initialen allergischen Atemwegsentzündung unter Verwendung des Gases NO₂ war es schon in Vorversuchen möglich erste Hinweise auf ein Antigen-unabhängiges Überleben dieser Zellen aufzuzeigen. Inwiefern diese Zellen somit dem Pool der langlebigen Plasmazellen angehören und welche genaue Rolle diese Zellen in der Pathogenese der allergischen Erkrankungen spielen, muss in weiterführenden Experimenten noch näher bestimmt werden.
2. ob pulmonale Plasmazellen bzw. lokale Plasmazellen der Milz und des Knochenmarkes unterschiedliche Populationen mit unterschiedlicher Herkunft und Eigenschaften darstellen.
3. die Entstehung und Migration der pulmonalen Plasmazellpopulation in oder an den Zielorganen. Dabei scheint der Chemokinrezeptor CXCR3 eine besondere Rolle für die Migration in die Lunge zu spielen. Dessen Liganden, so zeigten erste Versuche, werden auch während des Entzündungsprozesses in erhöhter Konzentration produziert.
4. die Bestimmung einer potentiell immunmodulierenden Rolle der pulmonalen Plasmazellen über die Produktion von Neurotrophinen und weiterer, bisher unbekannter, Faktoren. Entsprechende Transkriptomanalysen isolierter pulmonaler Plasmazellen sollen in Zukunft erste Hinweise auf die „Ausstattung“ der Zellen liefern.
5. die Bestimmung der intrazellulären Vorgänge welche ein Langzeitüberleben sichern. Weitere intensive *in vitro* Untersuchungen bezüglich der Rolle von XBP1 und dessen Zielgenen sowie der Einfluss Plasmazell-spezifischer Faktoren wie Blimp1 im

Überleben sind von besonderer Bedeutung für das Verständnis für die humorale Gedächtnisimmunantwort. Diese Arbeiten müssen aber aufgrund der starken Limitationen primärer Plasmazellen voraussichtlich mittels spezifischer Myelomazelllinien durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Der Begriff der Allergie umfasst eine Vielzahl von Krankheitsbildern, denen allen eine überschießende Immunantwort gegenüber meist harmlosen Antigenen, den Allergenen, gemeinsam ist. Als allergisches Asthma wird dabei die chronische Entzündung der Atemwege, und den damit verbundenen Atemwegsumbau, aufgrund allergischer Reaktionen bezeichnet. Die Bildung Allergen-spezifischer IgE spielt bei der Initiierung des allergischen Entzündungsprozesses eine zentrale Rolle. Die Regulation der lokalen Antikörperproduktion über die Lebensdauer der Antikörper-sezernierenden Zellen, den Plasmazellen, und die damit verbundene Chronifizierung der Immunantwort stellt daher eine zentrale Fragestellung innerhalb allergischer Erkrankungen dar. Plasmazellen sind terminal differenzierte B-Zellen, welche aus der Aktivierung einer B-Zelle durch spezifischen Antigenkontakt hervorgehen. Die Lebensdauer der entstandenen Plasmazellen ist dabei abhängig von gewebspezifischen Signalen aus dem umgebenden Mikromilieu, welche über noch unbekannte Mechanismen die Zellhomöostase aufrechterhalten, und daher als Überlebensnische bezeichnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals, mit Hilfe durchflusszytometrischer und molekularbiologischer Methoden, die Abhängigkeit des Überlebens reifer, teilungsinaktiver Plasmazellen vom lokalen Mikromilieu innerhalb der allergischen Atemwegsentzündung gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit haben wir die lokal produzierten Neurotrophine NGF und NT3 als Überlebensfaktoren für diese Zellen *in vitro* und *in vivo* identifiziert. Insbesondere spielt die Interaktion von NGF mit seinem spezifischen Rezeptor TrkA in der Vermittlung des Überlebens pulmonaler Plasmazellen sowie der lokalen IgE-Produktion in der Lunge eine wichtige Rolle. Die stabile Zellhomöostase konnte ebenfalls mit der verstärkten mRNA-Produktion antiapoptotischer Proteine, wie Bcl2, NF-kappaB und XBP1 assoziiert werden. Die Regulation der lokalen Antikörperproduktion in der allergischen Atemwegsentzündung ging mit einer spezifischen Anpassung an das vorherrschende Neurotrophin- bzw. NGF-Milieu einher. So weisen die Plasmazellpopulationen der Lunge, Milz und des Knochenmarks ein deutlich differenziertes Expressionsmuster der Neurotrophinrezeptoren auf. Die gleichzeitig beobachtete Bildung Neurotrophin-spezifischer mRNA in den isolierten Plasmazellen der verschiedenen Organe weist auf eine immunmodulierende Funktion der Plasmazellen innerhalb des komplexen Entzündungsgeschehens hin. Basierend auf dem Konzept der Überlebensnische für die Langzeitantikörperproduktion konnte so innerhalb dieser Arbeit erstmals die Regulation der

lokalen Antikörperproduktion in der allergischen Atemwegsentzündung des Asthma bronchiale näher charakterisiert werden.

5. Summary

Allergen-specific antibodies play a pivotal role in the induction and maintenance of allergic airway inflammation. During secondary immune responses, plasma cell survival and antibody production is mediated by extrinsic factors provided by the local environment (survival niches). It is unknown if neurotrophins, a characteristic marker of the allergic airway inflammation, influence plasma cell survival in the lung. Using a mouse model of allergic asthma, we found that plasma cells from the lung and spleen are distinct subpopulations exhibiting differential expression patterns of neurotrophins and their receptors (Trks). *In vitro*, the *nerve growth factor* (NGF) and *neurotrophin-3* (NT3) led to a dose dependent increase in viability of isolated pulmonary plasma cells due to up-regulation of the antiapoptotic Bcl2 pathway. In parallel, the expression of transcription factors that stimulate the production of immunoglobulins (*x-box binding protein 1* and *NF-kB* subunit *RelA*) was enhanced in plasma cells treated with NGF and NT3. These findings were supported *in vivo*: When the NGF pathway was blocked by intranasal application of a selective TrkA-inhibitor, sensitized mice showed reduced numbers of pulmonary plasma cells and developed lower levels of allergen-specific and total serum IgE in response to ovalbumin inhalation. This suggests that in the allergic airway inflammation, NGF/TrkA-mediated pulmonary IgE production contributes significantly to serum-IgE levels. We conclude that the neurotrophins NGF and NT3 act as survival factors for pulmonary plasma cells and thus are important regulators of the local antibody production in the allergic airway disease.

Literatur

- Akira, S. and T. Kishimoto (1997). "NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation." Adv Immunol **65**: 1-46.
- Allen, C. D., K. M. Ansel, et al. (2004). "Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5." Nat Immunol **5**(9): 943-52.
- Arpin, C., J. Banchereau, et al. (1997). "Memory B cells are biased towards terminal differentiation: a strategy that may prevent repertoire freezing." J Exp Med **186**(6): 931-40.
- Asher, M. I., U. Keil, et al. (1995). "International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods." Eur Respir J **8**(3): 483-91.
- Avery, D. T., S. L. Kalled, et al. (2003). "BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells." J Clin Invest **112**(2): 286-97.
- Avila, P. C. (2007). "Does anti-IgE therapy help in asthma? Efficacy and controversies." Annu Rev Med **58**: 185-203.
- Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." Nature **392**(6676): 565-568.
- Barnes, P. J. (2008). "Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Nat Rev Immunol **8**(3): 183-92.
- Bayas, A., N. Kruse, et al. (2003). "Modulation of cytokine mRNA expression by brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells." Neurosci Lett **335**(3): 155-8.
- Beattie, M. S., A. W. Harrington, et al. (2002). "ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury." Neuron **36**(3): 375-386.
- Beier, K. C., A. Hutloff, et al. (2004). "Inducible costimulator-positive T cells are required for allergen-induced local B-cell infiltration and antigen-specific IgE production in lung tissue." J Allergy Clin Immunol **114**(4): 775-82.
- Benedetti, M., A. Levi, et al. (1993). "Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(16): 7859-63.
- Bentley, A. M., Q. Meng, et al. (1993). "Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics." Am J Respir Cell Mol Biol **8**(1): 35-42.
- Bibel, M., E. Hoppe, et al. (1999). "Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR." EMBO J **18**(3): 616-22.

- Bonini, S., A. Lambiase, et al. (1996). "Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10955-60.
- Bousquet, J., P. K. Jeffery, et al. (2000). "Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling." Am J Respir Crit Care Med **161**(5): 1720-1745.
- Bracci-Laudiero, L., L. Aloe, et al. (2002). "NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF?" J Neuroimmunol **123**(1-2): 58-65.
- Bracci-Laudiero, L., L. Aloe, et al. (2002). "NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF?" J Neuroimmunol, **123**(1-2): 58-65.
- Brandtzaeg, P., I. N. Farstad, et al. (1999). "The B-cell system of human mucosae and exocrine glands." Immunol Rev **171**: 45-87.
- Braun, A., E. Appel, et al. (1998). "Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma." Eur J Immunol **28**(10): 3240-3251.
- Braun, A., E. Appel, et al. (1998). "Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma." Eur J Immunol **28**(10): 3240-51.
- Braun, A., M. Lommatzsch, et al. (1999). "Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation." Am J Respir Cell Mol Biol **21**(4): 537-46.
- Brewer, J. P., A. B. Kisselgof, et al. (1999). "Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice." Am J Respir Crit Care Med **160**(4): 1150-1156.
- Brewer, J. W. and L. M. Hendershot (2005). "Building an antibody factory: a job for the unfolded protein response." Nat.Immunol **6**(1): 23-29.
- Busse, W. W. and J. E. Gern (1997). "Viruses in asthma." J Allergy Clin Immunol **100**(2): 147-150.
- Calfon, M., H. Zeng, et al. (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." Nature **415**(6867): 92-6.
- Campbell, N., X. Y. Yio, et al. (1999). "The intestinal epithelial cell: processing and presentation of antigen to the mucosal immune system." Immunol Rev **172**: 315-324.
- Cassese, G., S. Arce, et al. (2003). "Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals." J Immunol **171**(4): 1684-1690.
- Cassese, G., S. Arce, et al. (2003). "Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals." J Immunol **171**(4): 1684-90.

- Cassese, G., S. Lindenau, et al. (2001). "Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells." Eur.J Immunol **31**(9): 2726-2732.
- Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.
- Chen-Kiang, S. (2005). "Biology of plasma cells." Best.Pract.Res.Clin Haematol. **18**(4): 493-507.
- Chevrier, S., C. Genton, et al. (2009). "CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(10): 3895-900.
- Chvatchko, Y., M. H. Kosco-Vilbois, et al. (1996). "Germinal center formation and local immunoglobulin E (IgE) production in the lung after an airway antigenic challenge." J Exp Med **184**(6): 2353-60.
- Clark, M. R. (1997). "IgG effector mechanisms." Chem.Immunol **65**: 88-110.
- Cohn, L., J. A. Elias, et al. (2004). "Asthma: mechanisms of disease persistence and progression." Annu.Rev Immunol **22**: 789-815.
- Cooper, N. R. (1985). "The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component." Adv.Immunol **37**: 151-216.
- Cortes, M. and K. Georgopoulos (2004). "Aiolos is required for the generation of high affinity bone marrow plasma cells responsible for long-term immunity." J Exp Med **199**(2): 209-219.
- Credle, J. J., J. S. Finer-Moore, et al. (2005). "On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 18773-84.
- Croft, M. and S. L. Swain (1991). "B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4, and IL-6." J Immunol **146**(12): 4055-4064.
- de Silva, D., S. Davis-Kaplan, et al. (1997). "Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue of ceruloplasmin." J Biol Chem **272**(22): 14208-13.
- Dechant, G., S. Biffo, et al. (1993). "Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB." Development **119**(2): 545-58.
- DeFreitas, M. F., P. S. McQuillen, et al. (2001). "A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons." J Neurosci **21**(14): 5121-9.
- Dohi, M., S. Tsukamoto, et al. (1999). "Noninvasive system for evaluating the allergen-specific airway response in a murine model of asthma." Lab Invest **79**(12): 1559-1571.
- Dowling, P., X. Ming, et al. (1999). "Up-regulated p75NTR neurotrophin receptor on glial cells in MS plaques." Neurology **53**(8): 1676-82.

- Edling, A. E., T. Nanavati, et al. (2004). "Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells." J Neurosci Res **77**(5): 709-17.
- Ehrhard, P. B., P. Erb, et al. (1994). "Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation." J Immunol **152**(6): 2705-2709.
- Ehrhard, P. B., P. Erb, et al. (1994). "Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation." J Immunol **152**(6): 2705-9.
- Elias, J. A., Z. Zhu, et al. (1999). "Airway remodeling in asthma." J Clin Invest **104**(8): 1001-1006.
- Emmanuele, L., J. Ortmann, et al. (2003). "Lovastatin stimulates human vascular smooth muscle cell expression of bone morphogenetic protein-2, a potent inhibitor of low-density lipoprotein-stimulated cell growth." Biochem.Biophys.Res.Comm. **302**(1): 67-72.
- Epstein, M. M. (2004). "Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease?" Int Arch Allergy Immunol **133**(1): 84-100.
- Fairfax, K. A., A. Kallies, et al. (2008). "Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches." Semin.Immunol **20**(1): 49-58.
- Finkbeiner, S. (2000). "CREB couples neurotrophin signals to survival messages." Neuron **25**(1): 11-4.
- Fischer, S. F., P. Bouillet, et al. (2007). "Proapoptotic BH3-only protein Bim is essential for developmentally programmed death of germinal center-derived memory B cells and antibody-forming cells." Blood **110**(12): 3978-3984.
- Fox, A. J., H. J. Patel, et al. (2001). "Release of nerve growth factor by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases." Eur J Pharmacol **424**(2): 159-62.
- Freund-Michel, V. and N. Frossard (2008). "The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases." Pharmacol Ther **117**(1): 52-76.
- Frossard, N., V. Freund, et al. (2004). "Nerve growth factor and its receptors in asthma and inflammation." Eur J Pharmacol **500**(1-3): 453-65.
- Garside, P., E. Ingulli, et al. (1998). "Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node." Science **281**(5373): 96-99.
- Germain, R. N. (1994). "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." Cell **76**(2): 287-299.
- Gould, H. J. and B. J. Sutton (2008). "IgE in allergy and asthma today." Nat.Rev Immunol **8**(3): 205-217.
- Gulbranson-Judge, A. and I. MacLennan (1996). "Sequential antigen-specific growth of T cells in the T zones and follicles in response to pigeon cytochrome c." Eur.J Immunol **26**(8): 1830-1837.

- Hahn, C., A. P. Islamian, et al. (2006). "Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation." J Allergy Clin Immunol **117**(4): 787-794.
- Harada, H., M. M. Kawano, et al. (1993). "Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells." Blood **81**(10): 2658-2663.
- Hargreaves, D. C., P. L. Hyman, et al. (2001). "A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements." J Exp Med **194**(1): 45-56.
- Hayakawa, K., M. Asano, et al. (2003). "Positive selection of anti-thy-1 autoreactive B-1 cells and natural serum autoantibody production independent from bone marrow B cell development." J Exp Med **197**(1): 87-99.
- Haze, K., H. Yoshida, et al. (1999). "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress." Mol Biol Cell **10**(11): 3787-99.
- Hempstead, B. L. (2002). "The many faces of p75NTR." Curr Opin Neurobiol **12**(3): 260-7.
- Hempstead, B. L., D. Martin-Zanca, et al. (1991). "High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor." Nature **350**(6320): 678-83.
- Henkart, P. A. (1996). "ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death?" Immunity **4**(3): 195-201.
- Hibi, T. and H. M. Dosch (1986). "Limiting dilution analysis of the B cell compartment in human bone marrow." Eur J Immunol **16**(2): 139-45.
- Hikawa, S., H. Kobayashi, et al. (2002). "Expression of neurotrophins and their receptors in peripheral lung cells of mice." Histochem Cell Biol **118**(1): 51-8.
- Hirano, T. and T. Kishimoto (1989). "Interleukin 6 and plasma cell neoplasias." Prog.Growth Factor Res. **1**(3): 133-142.
- Ho, F., J. E. Lortan, et al. (1986). "Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations." Eur.J Immunol **16**(10): 1297-1301.
- Hogan, S. P., A. Koskinen, et al. (1998). "Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice." Am J Respir Crit Care Med **157**(1): 210-218.
- Holgate, S. T., K. S. Bodey, et al. (1997). "Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge." Am J Respir Crit Care Med **156**(5): 1377-1383.
- Hollenbach, E., M. Neumann, et al. (2004). "Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease." FASEB J **18**(13): 1550-2.

- Holt, P. G., A. H. Rose, et al. (1981). "Induction of adjuvant-independent IgE responses in inbred mice: primary, secondary, and persistent IgE responses to ovalbumin and ovomucoid." Int Arch Allergy Appl.Immunol **65**(1): 42-50.
- Holt, P. G., J. D. Sedgwick, et al. (1984). "Long-lived IgE- and IgG-secreting cells in rodents manifesting persistent antibody responses." Cell Immunol **89**(2): 281-289.
- Horii, Y., A. Muraguchi, et al. (1989). "Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis." J Immunol **143**(12): 3949-55.
- Hoyle, G. W., R. M. Graham, et al. (1998). "Hyperinnervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor." Am J Respir Cell Mol Biol. **18**(2): 149-157.
- Hutloff, A., K. Buchner, et al. (2004). "Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum. **50**(10): 3211-3220.
- Iwakoshi, N. N., A. H. Lee, et al. (2003). "It's a good year for Blimp-1 (and plasma cells)." Immunity **19**(4): 466-8.
- Iwakoshi, N. N., A. H. Lee, et al. (2003). "The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response." Immunol Rev **194**: 29-38.
- Janeway, C. A., Jr. (1976). "The specificity of T lymphocyte responses to chemically defined antigens." Transplant.Rev **29**: 164-188.
- Jarjour, N. N., W. J. Calhoun, et al. (1997). "The immediate and late allergic response to segmental bronchopulmonary provocation in asthma." Am J Respir Crit Care Med **155**(5): 1515-1521.
- Jeffery, P. K. (2001). "Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease." Am J Respir Crit Care Med **164**(10 Pt 2): S28-38.
- Jeffery, P. K. (2004). "Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Proc.Am Thorac.Soc. **1**(3): 176-183.
- Johnson, G. V. and C. D. Bailey (2003). "The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease." Exp Neurol **183**(2): 263-8.
- Jungsuwadee, P., G. Dekan, et al. (2002). "Recurrent aerosol antigen exposure induces distinct patterns of experimental allergic asthma in mice." Clin Immunol **102**(2): 145-153.
- Jungsuwadee, P., G. Dekan, et al. (2004). "Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice." Clin Immunol **110**(1): 13-21.
- Juo, P., C. J. Kuo, et al. (1997). "Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases." Mol Cell Biol **17**(1): 24-35.

- Kaplan, D. R. and F. D. Miller (2000). "Neurotrophin signal transduction in the nervous system." Curr Opin Neurobiol **10**(3): 381-91.
- Kelsoe, G. (1996). "The germinal center: a crucible for lymphocyte selection." Semin.Immunol **8**(3): 179-184.
- Kerschensteiner, M., E. Gallmeier, et al. (1999). "Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?" J Exp Med **189**(5): 865-70.
- Kerzel, S., G. Path, et al. (2003). "Pan-neurotrophin receptor p75 contributes to neuronal hyperreactivity and airway inflammation in a murine model of experimental asthma." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(2): 170-178.
- Khursigara, G., J. Bertin, et al. (2001). "A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2." J Neurosci **21**(16): 5854-63.
- Kimata, H., A. Yoshida, et al. (1991). "Stimulation of Ig production and growth of human lymphoblastoid B-cell lines by nerve growth factor." Immunology **72**(3): 451-452.
- Kimata, Y., Y. Ishiwata-Kimata, et al. (2007). "Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins." J Cell Biol **179**(1): 75-86.
- Kishimoto, T. (1989). "The biology of interleukin-6." Blood **74**(1): 1-10.
- KleinJan, A., J. G. Vinke, et al. (2000). "Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients." Eur Respir J **15**(3): 491-7.
- Kobayashi, H., G. J. Gleich, et al. (2002). "Human eosinophils produce neurotrophins and secrete nerve growth factor on immunologic stimuli." Blood **99**(6): 2214-2220.
- Kopf, M., G. Le Gros, et al. (1995). "Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6 deficient mice." Immunol Rev **148**: 45-69.
- Kosco, M. H., G. F. Burton, et al. (1989). "Antibody-forming cell induction during an early phase of germinal centre development and its delay with ageing." Immunology **68**(3): 312-318.
- Kovalchuk, A. L., J. S. Kim, et al. (2002). "IL-6 transgenic mouse model for extraosseous plasmacytoma." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1509-14.
- Kummer, J. L., P. K. Rao, et al. (1997). "Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **272**(33): 20490-4.
- Lambiase, A., L. Bracci-Laudiero, et al. (1997). "Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors." J Allergy Clin Immunol **100**(3): 408-14.

- Lee, A. H., N. N. Iwakoshi, et al. (2003). "Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells." Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A **100**(17): 9946-9951.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, et al. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." Nature **372**(6508): 739-46.
- Lee, K., W. Tirasophon, et al. (2002). "IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response." Genes Dev **16**(4): 452-66.
- Lee, R., P. Kermani, et al. (2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." Science **294**(5548): 1945-8.
- Leon, A., A. Buriani, et al. (1994). "Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3739-43.
- Levi-Montalcini, R., R. Dal Toso, et al. (1995). "Update of the NGF saga." J Neurol Sci **130**(2): 119-27.
- Li, L., S. Krajewski, et al. (1997). "The apoptosis and proliferation of SAC-activated B cells by IL-10 are associated with changes in Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1 expression." Cell Immunol **178**(1): 33-41.
- Liou, H. C., M. R. Boothby, et al. (1990). "A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter." Science **247**(4950): 1581-4.
- Lippa, B., J. Morris, et al. (2006). "Discovery of novel isothiazole inhibitors of the TrkA kinase: structure-activity relationship, computer modeling, optimization, and identification of highly potent antagonists." Bioorg Med Chem Lett **16**(13): 3444-8.
- Liu, Y. J., J. Zhang, et al. (1991). "Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens." Eur.J Immunol **21**(12): 2951-2962.
- Lommatzsch, M., A. Braun, et al. (1999). "Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions." Am J Pathol **155**(4): 1183-93.
- London, C. A., M. P. Lodge, et al. (2000). "Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells." J Immunol **164**(1): 265-272.
- Lu, Z. Y., X. G. Zhang, et al. (1995). "Interleukin-10 is a proliferation factor but not a differentiation factor for human myeloma cells." Blood **85**(9): 2521-7.
- Luo, S. and A. S. Lee (2002). "Requirement of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway for the induction of the 78 kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin heavy-chain binding protein by azetidine stress: activating transcription factor 6 as a target for stress-induced phosphorylation." Biochem J **366**(Pt 3): 787-95.

- Ma, W., P. J. Bryce, et al. (2002). "CCR3 is essential for skin eosinophilia and airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic skin inflammation." J Clin Invest **109**(5): 621-628.
- MacLennan, I. C. (2005). "Germinal centers still hold secrets." Immunity **22**(6): 656-657.
- MacLennan, I. C., A. Gulbranson-Judge, et al. (1997). "The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop." Immunol Rev **156**: 53-66.
- Mahadeo, D., L. Kaplan, et al. (1994). "High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors." J Biol Chem **269**(9): 6884-91.
- Majdan, M. and F. D. Miller (1999). "Neuronal life and death decisions functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors." Int J Dev Neurosci **17**(3): 153-61.
- Mandel, B. (1976). "Neutralization of poliovirus: a hypothesis to explain the mechanism and the one-hit character of the neutralization reaction." Virology **69**(2): 500-510.
- Manz, R. A., S. Arce, et al. (2002). "Humoral immunity and long-lived plasma cells." Curr.Opin.Immunol **14**(4): 517-521.
- Manz, R. A., M. Lohning, et al. (1998). "Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen." Int Immunol **10**(11): 1703-11.
- Manz, R. A., A. Thiel, et al. (1997). "Lifetime of plasma cells in the bone marrow." Nature **388**(6638): 133-134.
- Melchers, F., E. ten Boekel, et al. (2000). "Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells." Immunol Rev **175**: 33-46.
- Micera, A., E. Vigneti, et al. (2001). "Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98**(11): 6162-6167.
- Mihara, M., Y. Moriya, et al. (1995). "Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor." Br J Rheumatol **34**(4): 321-5.
- Minges Wols, H. A., J. A. Ippolito, et al. (2007). "The effects of microenvironment and internal programming on plasma cell survival." Int Immunol **19**(7): 837-46.
- Minges Wols, H. A., G. H. Underhill, et al. (2002). "The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity." J Immunol **169**(8): 4213-4221.
- Miyasaka, N., K. Sato, et al. (1989). "Constitutive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 from inflammatory synovium." Clin Immunol Immunopathol **52**(2): 238-47.

- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu.Rev Immunol **7**: 145-173.
- Mosmann, T. R., L. Li, et al. (1997). "Differentiation and functions of T cell subsets." Ciba Found.Symp. **204**: 148-154.
- Mowla, S. J., H. F. Farhadi, et al. (2001). "Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor." J Biol Chem **276**(16): 12660-6.
- Muehlinghaus, G., L. Cigliano, et al. (2005). "Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells." Blood **105**(10): 3965-3971.
- Murakami, M. and T. Honjo (1995). "Involvement of B-1 cells in mucosal immunity and autoimmunity." Immunol Today **16**(11): 534-539.
- Nagasawa, T. (2006). "Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development." Nat.Rev Immunol **6**(2): 107-116.
- Nagasawa, T., S. Hirota, et al. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature **382**(6592): 635-638.
- Nassenstein, C., A. Braun, et al. (2003). "The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma." J Exp Med **198**(3): 455-467.
- Nassenstein, C., A. Braun, et al. (2003). "The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma." J Exp Med **198**(3): 455-67.
- Nie, Y., J. Waite, et al. (2004). "The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity." J Exp Med **200**(9): 1145-1156.
- Nossal, G. J. (1962). "Genetic control of lymphopoiesis, plasma cell formation, and antibody production." Int Rev Exp Pathol. **1**: 1-72.
- O'Connor, B. P., M. W. Gleeson, et al. (2003). "The rise and fall of long-lived humoral immunity: terminal differentiation of plasma cells in health and disease." Immunol Rev **194**: 61-76.
- O'Connor, B. P., V. S. Raman, et al. (2004). "BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells." J Exp Med **199**(1): 91-98.
- O'Garra, A. and N. Arai (2000). "The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation." Trends Cell Biol. **10**(12): 542-550.

- O'Rourke, L., R. Tooze, et al. (1997). "Co-receptors of B lymphocytes." Curr.Opin.Immunol **9**(3): 324-329.
- Odendahl, M., H. Mei, et al. (2005). "Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response." Blood **105**(4): 1614-1621.
- Olgart, C. and N. Frossard (2001). "Human lung fibroblasts secrete nerve growth factor: effect of inflammatory cytokines and glucocorticoids." Eur Respir J **18**(1): 115-21.
- Olivari, S. and M. Molinari (2007). "Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins." FEBS Lett **581**(19): 3658-64.
- Otten, U., P. Ehrhard, et al. (1989). "Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 10059-63.
- Otten, U., J. L. Scully, et al. (1994). "Neurotrophins: signals between the nervous and immune systems." Prog.Brain Res. **103**: 293-305.
- Parker, D. C. (1993). "T cell-dependent B cell activation." Annu.Rev Immunol **11**: 331-360.
- Patapoutian, A. and L. F. Reichardt (2000). "Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance." Curr.Opin.Neurobiol. **10**(3): 392-399.
- Patapoutian, A. and L. F. Reichardt (2001). "Trk receptors: mediators of neurotrophin action." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 272-80.
- Pietersma, A., B. C. Tilly, et al. (1997). "p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level." Biochem Biophys Res Commun **230**(1): 44-8.
- Podolsky, D. K. (1999). "Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense." Am J Physiol **277**(3 Pt 1): G495-G499.
- Pugazhenth, S., E. Miller, et al. (1999). "Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein." J Biol Chem **274**(39): 27529-35.
- Quarcoo, D., O. Schulte-Herbruggen, et al. (2004). "Nerve growth factor induces increased airway inflammation via a neuropeptide-dependent mechanism in a transgenic animal model of allergic airway inflammation." Clin Exp Allergy **34**(7): 1146-51.
- Radbruch, A., G. Muehlinghaus, et al. (2006). "Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell." Nat.Rev Immunol **6**(10): 741-750.
- Ravetch, J. V. (1994). "Atopy and Fc receptors: mutation is the message?" Nat Genet **7**(2): 117-8.
- Ravetch, J. V. and J. P. Kinet (1991). "Fc receptors." Annu.Rev Immunol **9**: 457-492.

- Reimold, A. M., P. D. Ponath, et al. (1996). "Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1." J Exp Med **183**(2): 393-401.
- Renz, H. (2001). "Neurotrophins in bronchial asthma." Respir Res **2**(5): 265-8.
- Ricci, A., L. Felici, et al. (2004). "Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung." Am J Respir Cell Mol Biol **30**(1): 12-19.
- Ricci, A., S. Greco, et al. (2001). "Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer." Am J Respir Cell Mol Biol **25**(4): 439-46.
- Rochlitzer, S., C. Nassenstein, et al. (2006). "The contribution of neurotrophins to the pathogenesis of allergic asthma." Biochem Soc Trans **34**(Pt 4): 594-9.
- Rolink, A. and F. Melchers (1993). "B lymphopoiesis in the mouse." Adv.Immunol **53**: 123-156.
- Romanet-Manent, S., D. Charpin, et al. (2002). "Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference?" Allergy **57**(7): 607-613.
- Roost, H. P., M. F. Bachmann, et al. (1995). "Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity." Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A **92**(5): 1257-1261.
- Rosenberg, N. and P. W. Kincade (1994). "B-lineage differentiation in normal and transformed cells and the microenvironment that supports it." Curr.Opin.Immunol **6**(2): 203-211.
- Rosini, P., G. De Chiara, et al. (2004). "Nerve growth factor-dependent survival of CESS B cell line is mediated by increased expression and decreased degradation of MAPK phosphatase 1." J Biol.Chem. **279**(14): 14016-14023.
- Rothenberg, M. E. (1998). "Eosinophilia." N.Engl.J Med **338**(22): 1592-1600.
- Roux, P. P. and P. A. Barker (2002). "Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor." Prog Neurobiol **67**(3): 203-33.
- Roux, P. P., M. A. Colicos, et al. (1999). "p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure." J Neurosci **19**(16): 6887-96.
- Samoilova, E. B., J. L. Horton, et al. (1998). "IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells." J Immunol **161**(12): 6480-6.
- Santambrogio, L., M. Benedetti, et al. (1994). "Nerve growth factor production by lymphocytes." J Immunol **153**(10): 4488-95.
- Santos, S. D., P. J. Verveer, et al. (2007). "Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate." Nat.Cell Biol. **9**(3): 324-330.

- Schneider, P. (2005). "The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation." Curr.Opin.Immunol **17**(3): 282-289.
- Schroder, A. E., A. Greiner, et al. (1996). "Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis." Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A **93**(1): 221-225.
- Schropel, A., D. von Schack, et al. (1995). "Early expression of the nerve growth factor receptor ctrkA in chick sympathetic and sensory ganglia." Mol Cell Neurosci **6**(6): 544-66.
- Schulte-Herbruggen, O., C. Nassenstein, et al. (2005). "Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes." J Neuroimmunol **160**(1-2): 204-9.
- Schweitzer, A. N. and A. H. Sharpe (1998). "Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production." J Immunol **161**(6): 2762-2771.
- Sedgwick, J. D. and P. G. Holt (1985). "Down-regulation of immune responses to inhaled antigen: studies on the mechanism of induced suppression." Immunology **56**(4): 635-42.
- Shaffer, A. L., M. Shapiro-Shelef, et al. (2004). "XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation." Immunity **21**(1): 81-93.
- Shapiro-Shelef, M., K. I. Lin, et al. (2005). "Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow." J Exp Med **202**(11): 1471-1476.
- Slifka, M. K. and R. Ahmed (1998). "Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production." Curr.Opin.Immunol **10**(3): 252-258.
- Slifka, M. K., R. Antia, et al. (1998). "Humoral immunity due to long-lived plasma cells." Immunity **8**(3): 363-372.
- Smith, K. G., T. D. Hewitson, et al. (1996). "The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci." Eur.J Immunol **26**(2): 444-448.
- Smurthwaite, L., S. N. Walker, et al. (2001). "Persistent IgE synthesis in the nasal mucosa of hay fever patients." Eur J Immunol **31**(12): 3422-31.
- Snapper, C. M. and W. E. Paul (1987). "Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production." Science **236**(4804): 944-947.
- Solomon, A., L. Aloe, et al. (1998). "Nerve growth factor is preformed in and activates human peripheral blood eosinophils." J Allergy Clin Immunol **102**(3): 454-60.
- Sriburi, R., S. Jackowski, et al. (2004). "XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **167**(1): 35-41.

- Stavnezer, J., J. E. Guikema, et al. (2008). "Mechanism and regulation of class switch recombination." Annu Rev Immunol **26**: 261-92.
- Sze, D. M., K. M. Toellner, et al. (2000). "Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival." J Exp Med **192**(6): 813-821.
- Takhar, P., C. J. Corrigan, et al. (2007). "Class switch recombination to IgE in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic patients with asthma." J Allergy Clin Immunol **119**(1): 213-8.
- Tam, S. Y., M. Tsai, et al. (1997). "Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells." Blood **90**(5): 1807-20.
- Tan, Y., J. Rouse, et al. (1996). "FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2." EMBO J **15**(17): 4629-42.
- Tangye, S. G., D. T. Avery, et al. (2003). "A division-linked mechanism for the rapid generation of Ig-secreting cells from human memory B cells." J Immunol **170**(1): 261-9.
- Terstappen, L. W., S. Johnsen, et al. (1990). "Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry." Blood **76**(9): 1739-1747.
- Tew, J. G., R. M. DiLosa, et al. (1992). "Germinal centers and antibody production in bone marrow." Immunol Rev **126**: 99-112.
- Todd, D. J., A. H. Lee, et al. (2008). "The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity." Nat Rev Immunol **8**(9): 663-74.
- Tokoyoda, K., T. Egawa, et al. (2004). "Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development." Immunity **20**(6): 707-718.
- Tonnel, A. B., M. Joseph, et al. (1983). "Stimulation of alveolar macrophages in asthmatic patients after local provocation test." Lancet **1**(8339): 1406-1408.
- Torcia, M., L. Bracci-Laudiero, et al. (1996). "Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes." Cell **85**(3): 345-56.
- Torcia, M., L. Bracci-Laudiero, et al. (1996). "Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes." Cell **85**(3): 345-356.
- Torcia, M., G. De Chiara, et al. (2001). "Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release." J Biol.Chem. **276**(42): 39027-39036.
- Tsubaki, T., S. Takegawa, et al. (2005). "Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of early rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9 by synovial fibroblasts." Clin Exp Immunol **141**(2): 363-371.

- Vieira, P. and K. Rajewsky (1988). "The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice." Eur J Immunol **18**(2): 313-6.
- Virchow, J. C., P. Julius, et al. (1998). "Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation." Am J Respir Crit Care Med **158**(6): 2002-5.
- Wang, X. Z., H. P. Harding, et al. (1998). "Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses." EMBO J **17**(19): 5708-17.
- Wang, X. Z., M. Kuroda, et al. (1998). "Identification of novel stress-induced genes downstream of chop." EMBO J **17**(13): 3619-30.
- Wegmann, M., A. Fehrenbach, et al. (2005). "NO₂-induced airway inflammation is associated with progressive airflow limitation and development of emphysema-like lesions in C57bl/6 mice." Exp Toxicol Pathol **56**(6): 341-50.
- Wegmann, M., H. Fehrenbach, et al. (2005). "Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma." Clin Exp Allergy **35**(10): 1263-1271.
- Wenzel, S. E., A. A. Fowler, III, et al. (1988). "Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma." Am Rev Respir Dis. **137**(5): 1002-1008.
- Whitehead, G. S., J. K. Walker, et al. (2003). "Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **285**(1): L32-L42.
- Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, et al. (1998). "Interleukin-13: central mediator of allergic asthma." Science **282**(5397): 2258-2261.
- Wilson, B. E., E. Mochon, et al. (1996). "Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis." Mol Cell Biol **16**(10): 5546-56.
- Xia, Z., M. Dickens, et al. (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." Science **270**(5240): 1326-31.
- Xiang, Z. and G. Nilsson (2000). "IgE receptor-mediated release of nerve growth factor by mast cells." Clin Exp Allergy **30**(10): 1379-86.
- Ying, S., D. S. Robinson, et al. (1997). "Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells." Eur.J Immunol **27**(12): 3507-3516.
- Yoshida, H., T. Matsui, et al. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." Cell **107**(7): 881-91.

- Yoshida, H., T. Matsui, et al. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." Cell **107**(7): 881-891.
- Zarubin, T. and J. Han (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway." Cell Res **15**(1): 11-8.
- Zhu, Z., R. J. Homer, et al. (1999). "Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production." J Clin Invest **103**(6): 779-788.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Abram M, Wegmann M, Fokuhl V, Sonar S, Luger EO, Kerzel S, Radbruch A, Renz H, Zemlin M. Nerve growth factor and neurotrophin-3 mediate survival of pulmonary plasma cells during the allergic airway inflammation. J Immunol. 2009 Apr 15;182(8):4705-12.

Weitere Publikationen:

Elke O. Luger, PhD, Verena Fokuhl, MSc, Michael Wegmann, PhD, **Melanie Abram, MSc**, Kati Tillack, MSc, Gernot Achatz, PhD, Rudolf A. Manz, PhD, Margitta Worm Andreas Radbruch, PhD, MD, Harald Renz, MD. Induction of long-lived allergen-specific plasma cells by mucosal allergen challenge. J Allergy Clin Immunol. 2009 Oct;124(4):819-26.

Melanie Abram, Elke O. Luger, Sanchaita Sonar, Verena Fokuhl, Andreas Radbruch, Michael Wegmann, Harald Renz. NGF Increases Cell Viability of Isolated Plasma Cells from Inflamed Airways via TrkA Signalling in a Mouse Model of Allergic Asthma. J. Allergy Clin Immunol. 2008 Feb., 121 (2) Supplement (Abstractbook): 200

Gabriel G, **Abram M**, Keiner B, Wagner R, Klenk HD, Stech J. Differential polymerase activity in avian and mamalian cells determines host range of influenza virus. J Virol. 2007 Sep;81(17):9601-4.

Kongressbeiträge:

2007

Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinischen Immunologie (Mainzer Allergie Workshop), März 2007, Mainz

Vortrag: Local plasma cells express neurotrophin-receptors in a mouse model of chronic allergic asthma.

European Respiratory Society (ERS) Annual Congress 2007, September, Stockholm

Vortrag: Plasma cells in the airways express neurotrophins and neurotrophin-receptors in a mouse model of chronic allergic asthma.

2008

Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinischen Immunologie (Mainzer Allergie Workshop), März 2008, Mainz

Vortrag: NGF increases cell viability of isolated plasma cells from inflamed airways in a mouse model of allergic asthma.

American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI) Annual Meeting, März, 2008, Philadelphia

Posterpräsentation: NGF Increases Cell Viability of Isolated Plasma Cells from Inflamed Airways via TrkA Signalling in a Mouse Model of Allergic Asthma.

2009

Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinischen Immunologie (Mainzer Allergie Workshop), März 2009, Mainz

Vortrag: NGF (Nerve Growth Factor) - a specific survival factor for pulmonary plasma cells.

Abkürzungsverzeichnis

(-)	negativ
(+)	positiv
Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APRIL	a proliferation-inducing ligand
ASC	Antigen-presenting cell
BAFF	B lymphocyte activation factor
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALT	Bronchus-associated lymphoid tissue
BCMA	B cell maturation antigen
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CC	C-Chemokin
CD	Oberflächenantigen (cluster of differentiation)
CXCL	CX-Chemokin
Cy5	Cychrome 5
DNase	Desoxyribonuklease
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	Gramm
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
GC	Germinal center
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilo Dalton, 10^3 Da
l	Liter
m	milli bzw. Meter
M	Molar

MACS	Magnetic-associated cell sorting
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
μ	mikro
NGF	Nerve Growth Factor
NT	Neurotrophin
OVA	Ovalbumin
p75	p75-Rezeptor
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyllprotein
R	Rezeptor
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SAC	Staphylococcus aureus cowain
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SSC	Seitwärtsstreulicht (siteward scatter)
TACI	Transmembrane activator and calciu, modulator ligand
T _H	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Trk	Tropomyosin-related kinase
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA	very late antigen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
°C	Grad Celsius

Danksagung

Mein Dank gilt den zahlreichen Personen, die mich während der gesamten Arbeit unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuer Herrn Prof. Harald Renz für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, und auch Herrn Prof. Michael Bölker für die Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie. Des Weiteren gilt mein Dank Frau Prof. Renate Renkawitz-Pohl und Herrn Prof. Klaus Lingelbach als weitere Mitglieder der Prüfungskommission.

Ferner gilt mein Dank den Kooperationspartnern aus dem DRFZ in Berlin, für die schöne Zusammenarbeit. Vielen Dank vor allem an Verena Fokuhl, die geduldige ZuhörerIn!

Michael Wegmann, Stefanie Achenbach und Thomas Ruppertsberg danke ich für die tolle Unterstützung rund um die Arbeit. Ihnen und zusätzlich allen Mitgliedern und Ehemaligen der Arbeitsgruppe danke ich außerdem für die schönen wissenschaftlichen sowie nicht-wissenschaftlichen Gespräche und insbesondere für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ihr wart sehr tapfer mit mir!

Für das kritische Gegenlesen dieser Arbeit und vieles mehr danke ich Michael Zemlin, Petra Pfefferle und Lars Bullmann.

Vor allem meinen Eltern, meiner Schwester und Lars gilt mein allergrößter Dank. Ihr habt mich auf all meinen Schritten bis hierher stets unterstützt und motiviert. Ihr seid die Besten!

Curriculum Vitae

Promotion

Seit 02/2006 Philipps-Universität Marburg
Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Renz (klin. Chemie)
Titel der Dissertation: *Nerve Growth Factor* (NGF)- vermitteltes
Überleben pulmonaler Plasmazellen in der
Atemwegsentzündung des murinen allergischen Asthma
bronchiale

Hochschulausbildung

11/2004 – 07/2005 Philipps-Universität Marburg
Diplomarbeit mit Fach Virologie
Titel der Diplomarbeit: Funktionelle Charakterisierung der
Influenza-Polymerase.

09/2000 - 10/2004 Philipps-Universität Marburg
Studium der Biologie in den Hauptfächern:
Virologie, Zellbiologie und Parasitologie

Schulbildung

06/1999 Staatliches Lepsius-Gymnasium Naumburg/Saale
Allgemeine Hochschulreife
Prüfungsfächer: Biologie, Englisch, Deutsch, Geschichte

1993-1999 Staatliches Lepsius-Gymnasium Naumburg/Saale

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

***Nerve Growth Factor* (NGF) vermitteltes Überleben pulmonaler
Plasmazellen in der Atemwegsentzündung des murinen allergischen
Asthma bronchiale**

Selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen anderen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

